

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7652807号
(P7652807)

(45)発行日 令和7年3月27日(2025.3.27)

(24)登録日 令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
		請求項の数	39 (全146頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-579892(P2022-579892)	(73)特許権者	521271727
(86)(22)出願日	令和2年7月9日(2020.7.9)		サプリーム テクノロジーズ, ベー. フ
(65)公表番号	特表2023-541762(P2023-541762 A)		ェー.
(43)公表日	令和5年10月4日(2023.10.4)		SAPREME TECHNOLOGI
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/069340		ES B. V.
(87)国際公開番号	WO2021/259507		オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビル
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)		トホーフェン, アントニ ファン レーウ
審査請求日	令和5年7月7日(2023.7.7)		エンフックラーン 9, ビルディング ア
(31)優先権主張番号	2025900		ー1 2-1
(32)優先日	令和2年6月24日(2020.6.24)		Antonie van Leeuwen
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)		hoeklaan 9 Building
		(74)代理人	A12-1 3721 MA Bilth
			oven NETHERLANDS
			110002000
			弁理士法人栄光事務所
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単ドメイン抗体、サポニン及びエフェクター分子のコンジュゲート、それを含む医薬組成物、前記医薬組成物の治療的使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞中に移行させるためのコンジュゲートであって、
前記細胞に移行されるエフェクター分子と、
さらに s d A b と称される単ドメイン抗体と、
サポニンと、を含み、
前記エフェクター分子、前記 s d A b、及び前記サポニンは共有結合しており、
前記エフェクター分子はオリゴヌクレオチドであり、
前記サポニンは、キラ酸またはギブソゲニンから選択されるアグリコンコア構造を含む、
バイーデスモサイドトリテルペングリコシドであり、
前記サポニンが、前記アグリコンコア構造の C₃ 原子に結合された第1の糖鎖と前記アグリコンコア構造の C₂₈ 原子に結合された第2の糖鎖を含み、
前記第1の糖鎖は分岐しており、グルクロン酸単位を含み、
前記第2の糖鎖は分岐しており、フコース (Fuc)、ラムノース (Rha) およびキノボース (Qui) から選択される1または2以上の炭水化物単位を含み、
前記 s d A b が、前記細胞の細胞表面分子に結合することができる、コンジュゲート。
【請求項2】
抗体の重鎖に由来する V_Hドメイン、
抗体の軽鎖に由来する V_Lドメイン、及び

ラクダ科 (Camelidae) 起源又は Ig-NAR 起源の重鎖のみの抗体 (HCAb) に由来する V_HHドメイン
のいずれか 1 つ以上から選択される sdAb の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の
コンジュゲート。

【請求項 3】

少なくとも 2 つの sdAb を含み、前記少なくとも 2 つの sdAb の少なくとも 1 つが、
前記エフェクター分子及び／若しくは前記サポニンに共有結合している、請求項 1 又は
2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記少なくとも 2 つの sdAb が同じ sdAb である、請求項 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

細胞表面分子上の同じ結合部位に結合することができる 1 ～ 8 つの sdAb を含み、請
求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの前記 sdAb が、CD 71 に結合することができる、請求項 1 ～ 5 のい
ずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

前記 sdAb が、腫瘍細胞特異的受容体である腫瘍細胞表面受容体に結合することがで
きる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記腫瘍細胞特異的受容体が、CD 71、CA 125、EpCAM (17-1A)、C
D 52、CEA、CD 44v6、FAP、EGF-IR、インテグリン、シンデカン-1
、血管性インテグリンアルファ-Vベータ-3、HER2、EGFR、CD 20、CD 2
2、葉酸受容体 1、CD 146、CD 56、CD 19、CD 138、CD 27L 受容体、
前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、CanAg、インテグリンアルファ V、CA 6、CD
33、メソセリン、CripTo、CD 3、CD 30、CD 239、CD 70、CD 12
3、CD 352、DLL3、CD 25、エフリン A4、MUC-1、Trop 2、CEA
CAM5、CEACAM6、HER3、CD 74、PTK7、Notch3、FGF2、
C4.4A、FLT3、CD 38、FGFR3、CD 7、PD-L1、CTLA-4、C
D 52、PDGFRA、VEGFR1、VEGFR2、c-Met (HGFR)、EGF
R1、RANKL、ADAMTS5、CD 16、CXCR7 (ACKR3)、グルココル
チコイド誘導性 TNFR 関連タンパク質 (GITR) のいずれか 1 つ以上から選択される
、請求項 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記腫瘍細胞特異的受容体が、HER2、c-Met、VEGFR2、CXCR7、CD
71 及び EGF R1 から選択される、請求項 7 又は 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの sdAb が、クローン 11A4、クローン 18C3、クローン 2
2G12、クローン Q17 若しくはクローン Q17-C-タグによって生成される sdAb
から選択される HER2 に結合するための sdAb を含むか；又は EGF R に結合する
ための及びクローン抗 EGF R Q86-C-タグによって生成される sdAb を含むか
；又は CD 71 に結合するための及びクローン抗 CD 71 Q52-C-タグによって生
成される sdAb を含むか；又は HIV gp 41 に結合するための及びクローン抗 HIV
gp 41 Q8-C-タグによって生成される sdAb を含むか；又は配列番号 1、3、
5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 及び 31 の
いずれか 1 つの cDNA によってコードされる sdAb を含むか；又は配列番号 2、4、
6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、
36 ～ 72 のアミノ酸配列を有する前記 sdAb のいずれか 1 つを含む、請求項 1 ～ 9 の
いずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記コンジュゲートが、アルブミンに結合するさらなる異なる s d A b をさらに含む、請求項 10 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

前記さらなる異なる s d A b が、配列番号 33、34 及び 35 のアミノ酸配列のいずれか一つ以上を含む、請求項 11 に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドが、短い干渉 RNA (s i R N A)、短いヘアピン RNA (s h R N A)、抗ヘアピン型マイクロ RNA (m i R N A)、一本鎖 RNA、アプタマー RNA、二本鎖 RNA (d s R N A)、抗マイクロ RNA (抗 m i R N A、抗 m i R)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O)、mRNA、DNA、アンチセンス DNA、ロッキング核酸 (LNA)、架橋核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋核酸 (BNA^{NC})、BNA に基づく s i R N A、及び BNA に基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON) のいずれか 1 つ以上から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 14】

前記オリゴヌクレオチドが、化学修飾された s i R N A、代謝的に安定な s i R N A、及び化学修飾され代謝的に安定な s i R N A から選択される、請求項 13 に記載のコンジュゲート。

【請求項 15】

前記オリゴヌクレオチドが、アポリポタンパク質 B (a p o B)、トランスサイレチン (T T R)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型 (P C S K 9)、デルターアミノレプリン酸シンターゼ 1 (A L A S 1)、アンチトロニン 3 (A T 3)、グリコール酸オキシダーゼ (G O)、補体成分 C 5 (C C 5)、B 型肝炎ウイルス (H B V) の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、アルファ-1 アンチトリプシン (A A T) 及び乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) のいずれか 1 つの遺伝子をサイレンシングすることができる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

前記オリゴヌクレオチドが、a p o B、T T R、P C S K 9、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子の発現産物、H B V の S 遺伝子の発現産物、A A T 及び L D H のいずれか 1 つのタンパク質の発現に關与する mRNA を標的とすることができる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 17】

前記サポニンが、キラ酸であるアグリコンコア構造を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 18】

前記第 1 の糖鎖が、

G a l - (1→2) - [X y l - (1→3)] - G l c A -、
G l c - (1→2) - [G l c - (1→4)] - G l c A -、
G l c - (1→2) - A r a - (1→3) - [G a l - (1→2)] - G l c A -、
X y l - (1→2) - A r a - (1→3) - [G a l - (1→2)] - G l c A -、
G l c - (1→3) - G a l - (1→2) - [X y l - (1→3)] - G l c - (1→4)
) - G a l -、及び
R h a - (1→2) - G a l - (1→3) - [G l c - (1→2)] - G l c A - から選
択され、

並びに／又は

前記第 2 の糖鎖が、

R h a - (1→2) - [X y l - (1→4)] - R h a -、
R h a - (1→2) - [A r a - (1→3) - X y l - (1→4)] - R h a -、
X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [R 1 - (→4)] - F u c - (式中、R 1

10

20

30

40

50

は、4 E-メトキシケイ皮酸である)、

Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [R2- (→4)] - Fuc- (式中、R2
は、4 Z-メトキシケイ皮酸である)、

Xyl- (1→4) - [Gal- (1→3)] - Rha- (1→2) - 4-OAc-Fuc-、

Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2) - 3, 4-ジ-OAc-Fuc-、

Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2) - [R3- (→4)]
- 3-OAc-Fuc- (式中、R3は、4 E-メトキシケイ皮酸である)、

Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2)
- 4-OAc-Fuc-、

(Ara-又はXyl-) (1→3) - (Ara-又はXyl-) (1→4) - (Rha-
-又はFuc-) (1→2) - [4-OAc- (Rha-又はFuc-) (1→4)] -
(Rha-又はFuc-)、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Qui- (1→4)]
- Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2)
- Fuc-、

Xyl- (1→4) - [Gal- (1→3)] - Rha- (1→2) - Fuc-、

Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2) - Fuc-、

Ara/Xyl- (1→4) - Rha/Fuc- (1→4) - [Glc/Gal- (1→
2)] - Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2)
- [R4- (→4)] - Fuc- (式中、R4は、5-O- [5-O-Ara/Api-
3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メ
チル-オクタン酸である)、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [R5- (→4)] -
Fuc- (式中、R5は、5-O- [5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-
6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である)、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Rha- (1→3)]
- 4-OAc-Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2)
- [Rha- (1→3)] - 4-OAc-Fuc-、

6-OAc-Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3-O
Ac-Rha- (1→3)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3-OAc- Rha-
(1→3)] - Fuc-、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Qui- (1→4)]
- Fuc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - [Qui- (1→
4)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Xyl- (1→3)
- 4-OAc-Qui- (1→4)] - Fuc-、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3, 4-ジ-OAc-
Qui- (1→4)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - Fuc-、

6-OAc-Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - Fuc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2)
- Fuc-、

10

20

30

40

50

$\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-4-\text{OAc}-\text{Qui}-(1\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$
 $\text{Api}/\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-[\text{Glc}-(1\rightarrow3)]-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{Rha}-(1\rightarrow3)]-4\text{OAc}-\text{Fuc}-$
 $\text{Api}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-[\text{Glc}-(1\rightarrow3)]-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{Rha}-(1\rightarrow3)]-4\text{OAc}-\text{Fuc}-$
 $\text{Api}/\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-[\text{Glc}-(1\rightarrow3)]-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R6}-(\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$ (式中、R6は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、
 $\text{Api}/\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-[\text{Glc}-(1\rightarrow3)]-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R7}-(\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$ (式中、R7は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、
 $\text{Api}/\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-[\text{Glc}-(1\rightarrow3)]-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R8}-(\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$ (式中、R8は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、
 $\text{Api}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R9}-(\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$ (式中、R9は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、
 $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R10}-(\rightarrow4)]-\text{Fuc}-$ (式中、R10は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、
 $\text{Api}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R11}-(\rightarrow3)]-\text{Fuc}-$ (式中、R11は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である)、及び
 $\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{R12}-(\rightarrow3)]-\text{Fuc}-$ (式中、R12は、 $5-\text{O}-[5-\text{O}-\text{Ara}/\text{Api}-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタノイル}]-3, 5-\text{ジヒドロキシ}-6-\text{メチル}-\text{オクタン酸}$ である) から選択される、請求項1～17のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項19】

前記サポニンが、

- i. 前記アグリコンコア構造中のアルデヒド基が誘導体化されている、
 - ii. 前記第1の糖鎖におけるグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている、及び
 - iii. 前記第2の糖鎖における少なくとも1つのアセトキシ ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 基が誘導体化されている、
- の中の1、2又は3つである、請求項1～18のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項20】

前記少なくとも1つのサポニンが、

- i.
 - アルコールへの還元；
 - $\text{N}-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応を介するヒドラゾン結合への転換；
 - $\text{N}-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応を介するヒドラゾン結合への転換；又は
 - $\text{N}-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応を介するヒ

10

20

30

40

50

ドラゾン結合への転換、によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造；

i i . 2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) 又はN-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応を介するアミド結合への転換によって誘導体化されているカルボキシル基を含む第1の糖鎖；

i i i . 脱アセチル化によるヒドロキシル基 (HO-) への転換によって誘導体化されているアセトキシ基 (Me (CO) O-) を含む第2の糖鎖；又は

i v . 2つ又は3つの誘導体化 i . 、 i i . 及び／又は i i i . の任意の組み合わせを含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項21】

前記サポニンが、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、QS-7、QS1861、QS-7 api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21 A-apiro、QS-21 A-xylo、QS-21 B-apiro、QS-21 B-xylo、QS-21、QS-21A、QS-21B、若しくはその立体異性体、及び／又はその任意の組み合わせのいずれか1つ以上である、請求項1～20のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項22】

前記サポニンが、QS-21、SO1861、SA1641およびGE1741のいずれか1つ以上である、請求項1～21のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項23】

前記サポニンがSO1861である、請求項1～22のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項24】

前記 s d A b が、抗 C D 7 1 抗体 O K T - 9、トラスツズマブ、ペルツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、オビヌツズマブイブリツモマブ、オレゴボマブ、エドレコロマブ、セツキシマブ、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、ブレンツキシマブ、ゲムツズマブ、h u M y 9 - 6、エタラシズマブ、アレムツズマブ、エプラツズマブ、ピナツズマブ、モキセツモマブ、イノツズマブ、ラベツズマブ、ビバツズマブ、シブロツズマブ、抗 C D 1 9 抗体 h u B 4、抗 C a n A g 抗体 h u C 2 4 2、抗 C D 5 6 抗体 h u N 9 0 1、抗 C D 3 8 抗体 O K T - 1 0、ダラツムマブ、抗 C A 6 抗体 D S 6、抗 I G F - 1 R 抗体 3 B 7、シズツムマブ、抗インテグリン抗体 C N T O 9 5、抗シンデカン-1 抗体 B - B 4、及びポラツズマブの免疫グロブリンのいずれか1つ以上に由来するか又は基づく、請求項1～23のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項25】

前記 s d A b が、トラスツズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、マツズマブ、及び抗 C D 7 1 抗体 O K T - 9 の免疫グロブリンのいずれか1つ以上に由来するか又は基づく、請求項1～24のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項26】

前記エフェクター分子が、直接的に、または、リンカーを介して前記 s d A b に共有結合している、請求項1～25のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項27】

前記サポニンが、直接的に、または、リンカーを介して前記 s d A b 及び／又は前記エフェクター分子に共有結合している、請求項1～26のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 28】

前記コンジュゲートが三官能性リンカーを含み、前記 s d A b、前記サポニン、及び前記エフェクター分子が別々に、直接的に、又はリンカーを介して前記三官能性リンカーに別々に共有結合している、請求項 1～27 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 29】

前記サポニンが、前記サポニンの前記アグリコンコア構造の C₂₃ 位におけるアルデヒド基に共有結合しているリンカー N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) を介して共有結合している、請求項 1～28 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 30】

前記サポニンが、前記サポニンの前記アグリコンコア構造の C₃ ベーター-OH 基で結合される第 1 の糖鎖においてグルクロン酸単位を含むバイーデスモサイドサポニンであり、前記サポニンが、前記第 1 の糖鎖における前記グルクロン酸単位のカルボキシル基を介して、前記少なくとも 1 つの s d A b 及び／又は前記少なくとも 1 つのエフェクター分子のアミノ酸残基に共有結合している、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 31】

前記少なくとも一つのサポニンが、前記サポニンの前記アグリコンコア構造の C₃ ベーター-OH 基での前記第 1 の糖鎖においてグルクロン酸単位を含み、前記グルクロン酸単位がリンカーに共有結合している、請求項 30 に記載のコンジュゲート。

【請求項 32】

前記 s d A b または前記エフェクター分子に結合したオリゴマー分子またはポリマー分子をさらに含み、前記コンジュゲートが 1 つ以上のサポニンを含む、請求項 1～31 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 33】

オリゴマー分子又はポリマー分子がデンドロンに基づくものである、請求項 32 に記載のコンジュゲート。

【請求項 34】

前記サポニンが、切断可能なリンカーを介して共有結合している、請求項 1～33 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 35】

前記切断可能なリンカーが、酸性条件下で切断にかけられる、請求項 34 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 36】

前記切断可能なリンカーが、pH ≤ 5.5 で切断にかけられる、請求項 34 又は 35 に記載のコンジュゲート。

【請求項 37】

請求項 1～36 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを医療用有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 38】

癌、自己免疫疾患、酵素欠損症に関連する疾患、遺伝子欠損に関連する疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病 A、血友病 B、アルファ-1 アンチトリプシン関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、アミロイドーシス及びトランスサイレチン媒介性アミロイドーシスから選ばれるいずれか 1 つ以上のヒト疾患を治療するための、請求項 37 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 39】

前記サポニンが、S O 1 8 6 1 又は Q S - 2 1 である、請求項 37 又は 38 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞中に移行させるためのコンジュゲートであって、互いに共有結合された、細胞に移行されることになる少なくとも1つのエフェクター分子、モノデスマサイドトリテルペングリコシド型又はバイデスマサイドトリテルペングリコシド型の少なくとも1つのサポニン、及び少なくとも1つの単ドメイン抗体（sdAb）を含み、sdAbが、前記細胞の細胞表面分子に結合することができるコンジュゲートに関する。本発明はまた、本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。さらに、本発明は、医薬としての使用のための本発明の医薬組成物に関する。加えて、本発明は、以下のいずれか1つ以上の治療又は発症予防における使用のための本発明の医薬組成物に関する：癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、酵素欠損症、酵素欠損症に関連する疾患、遺伝子欠損、遺伝子欠損に関連する疾患、ウイルス感染などの感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、アルファ-1アンチトリプシン関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、アミロイドーシス及びトランスサイレチン媒介性アミロイドーシス。本発明はまた、コンジュゲートを細胞の外部から前記細胞の内部に移行させるため又は本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子を細胞の外部から前記細胞の内部、好ましくは、前記細胞の細胞質ゾルに移行させるためのインビトロ又はインビボでの方法に関する。

【背景技術】

【0002】

治療的生物活性を有する分子は、理論上は必要とするヒト患者における癌などの疾患の治療のための効果的な治療薬としての適用に好適な場合が多い。典型的な例は、小分子生物活性部分である。しかしながら、現在クリニックで使用されている有望な薬物様分子及び治療薬の多くは、全てではないにしても、多くの欠点及び欠陥のうちの少なくとも1つを抱えている。ヒトの身体に投与されるとき、治療活性分子は、疾患又は健康問題の治療に関する所望の生物活性に加えて、オフターゲット効果を発揮する場合がある。そのようなオフターゲット効果は望まれないものであり、投与された分子の健康を或いは生命をも脅かす副作用の誘導のリスクを有する。そのような有害事象の発生により、多くの薬物様化合物及び治療薬部分が第ⅠⅠⅠ相臨床試験又は第ⅠⅤ相臨床試験（市販後の調査監視）で不合格になる。したがって、小分子治療薬などの薬物分子を提供することが強く望まれており、薬物分子の治療効果は、とりわけ、例えば、（1）疾患を促進する生体因子又は生物プロセスに高度に特異的である必要があり、（2）十分に安全である必要があり、（3）十分に効果的である必要があり、（4）非疾患細胞に対してほとんど又は全くオフターゲット活性を伴わずに疾患細胞に十分に誘導される必要があり、（5）十分に時宜を得た作用機序を有する必要があり（例えば、投与された薬物分子は、ある特定の時間枠内でヒト患者の標的化部位に到達し、及びある特定の時間枠において標的化部位に留まる必要がある）、及び／又は（6）患者の身体において十分に持続性の治療活性を有する必要がある。残念ながら、今日までに、本明細書において上で概説された有利な特徴の多くを又はさらには全てを有する「理想的な」治療薬は、既に長期間の集中的な調査並びに個別に対処された直面した困難及び欠陥のいくつかの分野においてなされた印象的な進展にもかかわらず、患者に利用可能ではない。

【0003】

化学療法は、癌治療のための最も重要な治療選択肢の1つである。しかしながら、健康な組織における分裂細胞を超えて癌細胞に対する特異性を有しないため、狭い治療域を付随する場合が多い。モノクローナル抗体の発明は、それらの特異的な結合特性を利用して、正常細胞を温存しながら癌細胞に細胞傷害性薬剤を標的化して送達するための機構としての可能性をもたらした。これは、抗体薬物コンジュゲート（ADC）を作製するための抗体への細胞傷害性エフェクター（ペイロード又はワーヘッドとしても知られる）の化学的コンジュゲーションによって達成され得る。通常、コンジュゲートされていない形態で限定的な治療指数（毒性用量と効果的な用量を比較する比率）を有するエムタンシン（DM1）などの非常に強力なペイロードが使用される。DM1のKadcyclaとしても知られるトラスツズマブ（ado-トラスツズマブエムタンシン）へのコンジュゲーション

ンは、サルにおいてDM1の耐容量を少なくとも2倍高める。治療用ADCを開発するために過去数十年に途方もない労力及び投資がなされてきた。しかしながら、有望な前臨床データにもかかわらず、ADCをクリニックに導くことは困難なままである。臨床使用のために承認された最初のADCは、2000年の再発性急性骨髄性白血病（AML）のためのゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターゲット、CD33標的化、Pfizer/Wyeth）であった。しかしながら、マイロターゲットは、その安全性プロファイルを含むいくつかの懸念のために連邦医薬品局（Federal Drug Administration）（FDA）の要求で販売中止になった。マイロターゲットで治療された患者は、従来の化学療法で治療された患者より多くの場合で死亡することが見出された。マイロターゲットは、推奨用量の引き下げ、化学療法との組み合わせ又は単剤での異なるスケジュール、及び新しい患者集団で2017年に再び上市が認められた。今日までに、5種のADCのみが臨床使用のために承認されており、一方でおよそ55種のADCの臨床開発が停止されている。しかしながら、関心は高いままであり、現時点でおよそ80種のADCが依然として、ほぼ600の臨床試験において臨床開発中である。

【0004】

患者によって通常許容されない毒性ペイロードを使用する可能性があるにもかかわらず、低い治療指数は、臨床開発において多くのADCの中止を占める主要な問題であり、これは、正常細胞に対するオフターゲット毒性、細胞傷害性薬剤に対する耐性の発生及び血行中の薬物の早計な放出などのいくつかの機構によって引き起こされ得る。FDAによるADCの系統的再評価は、大部分のADCの毒性プロファイルが、使用される抗体ではなく使用されるペイロードに従って分類することができることを見出し、毒性が、大部分はペイロードの早計な放出によって決定されることを示唆している。中止されたおよそ55種のADCのうち、少なくとも23種が不十分な治療指数に起因したと推定される。例えば、トラスツズマブテシリンコンジュゲート（ADCT-502、HER2-標的化、ADC治療薬）の開発は、顕著なレベルのHER2を発現する肺組織におけるオンターゲット、組織外効果におそらく起因する、低い治療指数のために最近中止された。加えて、第3相試験におけるいくつかのADCは、主要評価項目の欠落のために中止されている。例えば、新たに診断された神経膠芽腫を有する患者において試験されたデパツキシズマブマホドチンコンジュゲート（ABT-414、EGFR標的化、AbbVie）、及び白金耐性卵巣癌を有する患者において試験されたミルベツキシマブソラブタンシンコンジュゲート（IMGN853、葉酸受容体アルファ（FR α ）標的化、ImmunoGen）の第3相試験は、最近中止され、延命効果がないことを示している。臨床的に使用可能な用量のいくつかのADCは、その完全な抗癌活性に十分ではない可能性があることを認めることが重要である。例えば、ado-トラスツズマブエムタンシンは、ヒトにおいて3.6mg/kgのMTDを有する。乳癌の前臨床モデルにおいて、ado-トラスツズマブエムタンシンは、3mg/kg以上の用量レベルで腫瘍退縮を誘導したが、より強力な有効性は15mg/kgで観察された。これは、臨床的に投与される用量で、ado-トラスツズマブエムタンシンが、その最大の潜在的抗腫瘍効果を発揮しない可能性があることを示唆している。

【0005】

ADCは主に、抗体、ペイロードなどの細胞傷害性部分、及びリンカーで構成される。いくつかの新規の戦略が提案され、ADCの構成成分の各々を標的にする既存の問題を克服するための新規のADCの設計及び開発において実行された。例えば、抗体構成成分のための十分な抗原標的の同定及び検証によって、腫瘍における高い発現レベルを有し、正常組織において発現をほとんど又は全く有しない抗原、循環ADCにとって到達可能になるように細胞表面上に存在する抗原、及び結合後のADCの細胞中への内部移行を可能にする抗原、並びに活性の代替的機構を選択することによって、ADCの溶解性及び薬物抗体比（DAR）を高めるリンカーを設計し、最適化し、細胞外に化学療法剤を輸送することができるタンパク質によって誘導される耐性を克服し、さらなるペイロードの包含によりDAR比を高め、抗体均一性及び開発可能性を向上させるために抗体を選択し、最適化

する。ADCの技術的開発に加えて、分割された投与により投与スケジュールを変更する、体内分布試験を実施する、応答シグナルを早く捕捉し、応答の期間及び深さをモニターし、及び組み合わせ試験を通知するための患者選択を最適化するバイオマーカーを含める、などの新たな臨床的及びトランスレーショナルな戦略もまた、治療指数を最大化するために採用されている。

【0006】

臨床的な潜在力を有するADCの例は、ブレンツキシマブベドチン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブバースドトクス、及びポラツズマブベドチンなどのADCであり、リンパ性腫瘍及び多発性骨髄腫のための治療選択肢として評価される。(悪性)B細胞上のCD79bに結合するポラツズマブベドチン、及びCD22に結合するピナツズマブベドチンは、臨床試験において試験され、ADCはそれぞれ、同時投与されるリツキシマブ、CD20に結合するモノクローナル抗体と組み合わせられ、ペイロードとともに提供されない[B. Yu and D. Liu, Antibody-drug conjugates in clinical trials for lymphoid malignancies and multiple myeloma; Journal of Hematology & Oncology (2019) 12:94]。これらの例などのモノクローナル抗体の組み合わせは、前述のADCの望ましい特徴の多く又は全てを組み合わせる「魔法の弾丸」に到達するためのさらなるアプローチ及び試みである。

【0007】

一方、過去数十年において、核酸に基づく治療薬が開発中である。治療用核酸は、遺伝子療法、RNA干渉(RNAi)などのアプローチのためのデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO、AON)、及び短い干渉RNA(sRNA)、マイクロRNA、並びにDNA及びRNAアプタマーに基づくものであり得る。それらの多くは、DNA又はRNA発現のいずれかの阻害による作用の同じ基本的基盤を共有し、それにより疾患に関連する異常なタンパク質の発現を妨げる。遺伝子治療の分野において最も多くの臨床試験が行われており、世界中でほぼ2600件の臨床試験が進行中であるか又は完了しているが、第3相に入っているのは約4%にすぎない。この後にASOによる臨床試験が続く。ADCと同様に、多数の手法が探索されているにもかかわらず、治療用核酸は、臨床開発中に2つの主要な問題を共有している：細胞への送達及びオフターゲット効果。例えば、ペプチド核酸(PNA)、ホスホラアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)、ロックド核酸(LNA)及び架橋核酸(BNA)などのASOは、標的遺伝子の特異的に阻害し、及び特に小分子阻害剤又は中和抗体で標的化することが難しい遺伝子を阻害する魅力的な戦略として調査されている。現在、異なるASOの有効性は、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び筋萎縮性側索硬化症などの多くの神経変性疾患、並びにいくつかの癌段階においても試験されている。潜在的な治療剤としてのASOの適用は、標的細胞及び組織の細胞質及び/又は核へのそれらの送達のために安全及び有効な方法を必要とする。ASOの臨床的意義は実証されているが、インビトロ及びインビボの両方での非効率的な細胞への取り込みは、ASOの有効性を制限し、治療薬開発に対する障壁となっている。細胞への取り込みは用量の2%未満であり、活性部位でのASO濃度が低すぎるため効果的及び持続的なアウトカムが得られない。これは結果的に、オフターゲット効果を誘導する投与される用量の増加を必要とする。最も一般的な副作用は、補体カスケードの活性化、凝固カスケードの阻害及び免疫系のツール様受容体媒介性刺激である。

【0008】

化学療法は、最も一般的な小分子であるが、それらの有効性は、重篤なオフターゲット副作用毒性、並びにそれらの不十分な溶解性、迅速なクリアランス及び限定的な腫瘍暴露によって妨害される。ポリマー-薬物コンジュゲート(PDC)などの足場-小分子薬物コンジュゲートは、薬理学的活性を有する高分子構築物であり、担体足場(例えば、ポリエチレングリコール(PEG))に結合される小分子薬物の1つ以上の分子を含む。

【0009】

そのようなコンジュゲート原理は、数十年間注目され、調査されている。前臨床又は臨床開発下の小分子薬物のコンジュゲートの大部分は、腫瘍学的効能のためのものである。しかしながら、今日まで、癌に関連しない1つの薬物のみが2014年に慢性疼痛を有する患者におけるオピオイド誘導性便秘に関して承認されており（Movantik、オピオイドアンタゴニストナロキシソンのPEGオリゴマーコンジュゲート、AstraZeneca）、これは非腫瘍学効能である。ヒト対象の治療への薬物-足場コンジュゲートのトランスレーショナルな適用は、今のところ臨床的にほとんど成功していない。例えば、PK1（N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド（HPMA）コポリマードキソルビシン；Pharmacia、Pfizerによる開発）は、マウスモデルにおける固形腫瘍及び白血病の両方において優れた抗癌活性を示し、腫瘍学的効能のための臨床研究であった。それがヒトにおいて非特異的毒性の著しい軽減及び薬物動態の改善を実証したにもかかわらず、患者における抗癌活性の改善はわずかであることが判明し、結果として、PK1のさらなる開発は中止された。

10

【0010】

足場-小分子薬物コンジュゲートの失敗は、腫瘍部位でのその不十分な蓄積に少なくとも部分的に起因する。例えば、マウスモデルにおいて、PK1は、健康な組織（肝臓、腎臓、肺、脾臓、及び心臓）より腫瘍において45～250倍高い蓄積を示したが、腫瘍における蓄積は、臨床試験における患者の小さいサブセットにおいてのみ観察された。

【0011】

前述の問題に対する潜在的な解決策は、リポソームなどの薬物送達のためのナノ粒子系の適用である。リポソームは、1つ以上のリン脂質二重層からなる球状小胞であり、リン脂質が水中で分散されるときに自発的に形成される。リン脂質の両親媒性の特徴は、それに自己組織化の特性、乳化及び湿潤の特徴をもたらし、これらの特性は新薬及び新しい薬物送達系の設計に採用され得る。リポソーム送達系における薬物の封入は、薬物動態及び薬力学にわたる改善及び制御、組織標的化特性、毒性の減少及び薬物活性の強化などの薬物の直接的な投与と比較していくつかの利点をもたらす。そのような成功例は、小分子化学療法剤ドキソルビシン（Doxil：ドキソルビシンのペグ化リポソーム-被包形態；Myocet：非ペグ化リポソームドキソルビシン）のリポソーム被包形態であり、臨床使用のために承認されている。

20

【0012】

したがって、望まれる場合に非全身使用に適用可能である抗腫瘍療法などの薬物療法を可能にする解決策を見出す必要性が依然として存在し、薬物は、例えば、許容される安全性プロファイル、少ないオフターゲット活性、十分な有効性、患者の身体からの十分に低いクリアランス速度、十分に広い治療域などを有する。

30

【0013】

欧州特許第1623715B1において、サポニンと組み合わせられた標的細胞特異的結合分子にカップリングされた薬理的に活性な薬剤を含む組成物が記載されている。薬理的に活性な薬剤は、例えば、毒物である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0014】

本発明の実施形態に関して、生物活性化合物の改善又はそのような改善された生物活性化合物を含む組成物を提供することが第1の目標である。

【0015】

本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、（小分子）治療活性化合物を、それを必要とするヒト患者に投与するときに直面する非特異性の問題に対する解決策を提供することである。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、疾患を促進する生体因子又は生物プロセスに対して最適化されていない特異性を有する薬物の問題に対する解決策を提供することである。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、必要とするヒト患者に投与されるときに現行の薬物の不十分な安全性の特徴の問題に対する解決策を提供すること

50

である。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、必要とするヒト患者に投与されるときに所望のものより効果が低い現行の薬物の問題に対する解決策を提供することである。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、必要とするヒト患者に投与されるときに非疾患細胞に対してほとんど又は全くオフターゲット活性を伴わずに疾患細胞に十分に誘導されていない現行の薬物の問題に対する解決策を提供することである。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、現行の薬物が、必要とするヒト患者に投与されるときに十分に時宜を得た作用機序を有しない（例えば、投与された薬物分子は、ある特定の時間枠内でヒト患者の標的化部位に到達し、及びある特定の時間枠において標的化部位に留まる必要がある）という問題に対する解決策を提供することである。本発明の実施形態のいくつかの目的の1つは、現行の薬物が必要とするヒト患者に投与されるときに患者の身体において十分に持続性の治療活性を有しないという問題に対する解決策を提供することである。

10

【0016】

本発明の実施形態の上記の目的の少なくとも1つは、本発明に従って、 V_{HH} などの単一ドメイン抗体（sdAb）である細胞標的化部分、並びに少なくとも1つのサポニン及びタンパク質性毒素などの少なくとも1つのエフェクター部分及び／又はBNAなどのオリゴヌクレオチド、共有結合的に連結されたサポニンとともに提供されるADC及び／又は医薬としての使用にも好適な共有結合的に連結されたサポニンとともに提供されるAOCを含む、本発明の抗体-薬物コンジュゲート（ADC）又は抗体-BNA共有結合性複合体などの抗体-オリゴヌクレオチド（AOC）を提供することによって達成される。

20

【0017】

本発明は、特定の実施形態に関して記載されることになるが、本発明は、それに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。本明細書に記載される本発明の実施形態は、別段の指定がない限り、組み合わせ及び協同作用において機能し得る。

【0018】

本発明の第1の態様は、エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞中に移行させるためのコンジュゲートであって、直接的に又は少なくとも1つのリンカーを介して互いに共有結合された、細胞に移行されることになる少なくとも1つのエフェクター分子と、少なくとも1つの単一ドメイン抗体（sdAb）と、少なくとも1つのサポニンとを含み、少なくとも1つのサポニンが、モノデスマサイドトリテルペングリコシドであるか又はバイデスマサイドトリテルペングリコシドであり、sdAbが、前記細胞の細胞表面分子に結合することができるコンジュゲートに関する。

30

【0019】

本発明の第2の態様は、本発明のコンジュゲート、並びに任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0020】

本発明の第3の態様は、医薬としての使用のための本発明の医薬組成物に関する。

【0021】

本発明の第4の態様は、以下のいずれか1つ以上の治療又は発症予防における使用のための本発明の医薬組成物に関する：癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、酵素欠損症、酵素欠損症に関連する疾患、遺伝子欠損、遺伝子欠損に関連する疾患、ウイルス感染などの感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、アルファ-1アンチトリプシン関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、アミロイドーシス及びトランスサイレチン媒介性アミロイドーシス。

40

【0022】

本発明の第5の態様は、本発明のエフェクター分子（本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子）を細胞の外部から前記細胞の内部に、好ましくは、前記細胞の細胞質ゾルに移行させるための、インビトロ又はエクスピボでの方法であって、

a) その細胞表面上で、本発明のコンジュゲートによって含まれる少なくとも1つのsdAbのための結合部位であって、前記結合部位が、好ましくは、本明細書に記載される

50

とおり、細胞の細胞表面分子上に存在し、前記細胞が、好ましくは、肝臓細胞、ウイルス感染細胞などの異常な細胞、自己免疫細胞、遺伝子欠損を含む細胞、酵素欠損を含む細胞及び腫瘍細胞から選択される結合部位を発現する細胞を提供する工程；

b) 本発明のコンジュゲートであって、工程 a) において提供される細胞に移行されることになるエフェクター分子を含む前記コンジュゲートを提供する工程；及び

c) 工程 a) の細胞をインビトロ又はエキスピボで工程 b) のコンジュゲートと接触させる工程

を含み、

それにより、エフェクター分子を含む前記コンジュゲートを、細胞の外部から前記細胞の内部に移行させる工程、及び前記コンジュゲートの移行により、エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞の内部、好ましくは、前記細胞の細胞質ゾルに移行させる工程を含む、方法に関する。

【0023】

本発明の第6の態様は、本発明のコンジュゲートを細胞の外部から前記細胞の内部に移行させるためのインビトロ又はエキスピボでの方法であって、

a) その細胞表面上で、本発明のコンジュゲートによって含まれる少なくとも1つの s d A b のための結合部位であって、前記結合部位が、好ましくは、本明細書に記載されるとおり、細胞の細胞表面分子上に存在し、前記細胞が、好ましくは、肝臓細胞、ウイルス感染細胞などの異常な細胞、自己免疫細胞、遺伝子欠損を含む細胞、酵素欠損を含む細胞及び腫瘍細胞から選択される結合部位を発現する細胞を提供する工程；

b) 本発明のいずれか1つのコンジュゲートを提供する工程；及び

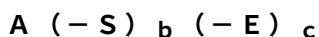
c) 工程 a) の細胞をインビトロ又はエキスピボで工程 b) のコンジュゲートと接触させる工程を含み、それにより、コンジュゲートを細胞の外部から前記細胞の内部に移行させる工程を含む方法に関する。

【0024】

本発明の態様は、本発明のコンジュゲート又は本発明の医薬組成物、並びに以下のいずれか1つ以上：癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、酵素欠損症、酵素欠損症に関連する疾患、遺伝子欠損、遺伝子欠損に関連する疾患、ウイルス感染などの感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、アルファ-1アンチトリプシン関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、アミロイドーシス及びトランスサイレチン媒介性アミロイドーシスの治療又は発症予防のための使用における前記コンジュゲート又は前記医薬組成物の使用のための指示書、又は本発明によるインビトロ又はエキスピボでの方法の適用のための指示書を含むキット・オブ・パーツに関する。

【0025】

本発明の態様は、本発明の s d A b などの細胞表面分子標的化分子を含み及び本発明の少なくとも1つのエフェクター部分を含み及び／又は本発明の少なくとも1つのサポニンを含む、構造CのADC若しくはAOCなどのコンジュゲート、又は半完成状態のADCコンジュゲート若しくは半完成状態のAOCコンジュゲート：



(構造C)

(式中、Aは、s d A b などの細胞表面分子標的化分子であり；

Sは、サポニンであり；

Eは、エフェクター部分であり；

b = 0 ~ 64、好ましくは、0、1、2、3、4、8、16、32、64又はその間にある任意の整数（若しくは小数部）であり；

c = 0 ~ 8、好ましくは、0、1、2、3、4、6、8又はその間にある任意の整数（若しくは小数部）であり；

Sは、A及び／又はEにカップリングされ、Eは、A及び／又はSにカップリングされ、好ましくは、Sは、Aにカップリングされ、Eは、Aにカップリングされる）に関する。

【0026】

定義

用語「タンパク質性」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、タンパク質様である分子を指し、分子が、ある程度、タンパク質に特徴的な物理化学的特性を有するか、タンパク質のものであるか、タンパク質に関連するか、タンパク質を含有するか、タンパク質に属するか、タンパク質からなるか、タンパク質に類似するか、又はタンパク質であることを意味する。例えば、「タンパク質性分子」において使用される場合の用語「タンパク質性」は、タンパク質に類似するか又はタンパク質である分子の少なくとも一部の存在を指し、「タンパク質」は、少なくとも2つの残基長のアミノ酸残基の鎖を含むように理解されることになり、したがって、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質並びにタンパク質又はタンパク質ドメインの集合体を含む。タンパク質性分子において、少なくとも2つのアミノ酸残基は、例えば、ペプチド結合などのアミド結合を介して結合される。タンパク質性分子において、アミノ酸残基は、天然のアミノ酸残基であり及び／又は修飾された天然のアミノ酸残基などの人工的なアミノ酸残基である。好ましい実施形態では、タンパク質性分子は、少なくとも2つのアミノ酸残基、好ましくは、2～約2000のアミノ酸残基を含む分子である。一実施形態では、タンパク質性分子は、2～20個（ペプチドに関して典型的）のアミノ酸を含む分子である。一実施形態では、タンパク質性分子は、21～1000個（ポリペプチド、タンパク質、タンパク質ドメイン、例えば、抗体、Fab、scFv、EGFなどの受容体のためのリガンドに関して典型的）のアミノ酸を含む分子である。好ましくは、アミノ酸残基は、ペプチド結合を介して（典型的には）結合される。本発明によれば、前記アミノ酸残基は、（修飾された）（非）天然アミノ酸残基であるか又はそれを含む。

【0027】

例えば、共有結合性コンジュゲートの一部としてエフェクター分子を参照する場合の用語「エフェクター分子」、又は「エフェクター部分」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、例えば、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖、（リン）脂質、DNA、RNAなどの核酸、酵素のいずれか1つ以上に選択的に結合することができる分子を指し、そのような1つ以上の標的分子の生物活性を調節する。エフェクター分子は、例えば、薬物分子などの小分子、タンパク質毒素などの毒素、BNAなどのオリゴヌクレオチド、異物性核酸若しくはsiRNA、酵素、ペプチド、タンパク質、又はその任意の組み合わせのいずれか1つ以上から選択される分子である。したがって、例えば、エフェクター分子又はエフェクター部分は、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖、（リン）脂質、DNA、RNAなどの核酸、酵素のいずれか1つ以上に選択的に結合することができ、及び標的分子への結合時に、そのような1つ以上の標的分子の生物活性を調節する、薬物分子などの小分子、タンパク質毒素などの毒素、BNAなどのオリゴヌクレオチド、異物性核酸若しくはsiRNA、酵素、ペプチド、タンパク質、又はその任意の組み合わせのいずれか1つ以上から選択される分子又は部分である。通常、エフェクター分子は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞などの細胞の内部、例えば、前記細胞の細胞質ゾル中において生物学的効果を発揮することができる。したがって、本発明のエフェクター分子又は部分は、細胞内エフェクター分子標的との相互作用によって細胞の代謝に影響を及ぼす任意の物質であり、このエフェクター分子標的は、エンドサイトーシス及びリサイクリング経路の区画及び小胞の内腔を除くが、これらの区画及び小胞の膜を含む細胞内部の任意の分子又は構造である。したがって、細胞内部の前記構造は、核、ミトコンドリア、クロロプラスト、小胞体、ゴルジ体、他の輸送小胞、細胞膜及び細胞質ゾルの内部を含む。したがって、典型的なエフェクター分子は、薬物分子、酵素、プラスミドDNA、抗体-薬物コンジュゲート（ADC）によって含まれる毒素などの毒素、siRNA、BNA、抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート（AOC）によって含まれる核酸などのオリゴヌクレオチドである。例えば、エフェクター分子は、（細胞内）酵素活性、遺伝子発現、又は細胞シグナル伝達を増大させることができるか又は低減することができるリガンドとして作用することができる分子である。

【0028】

用語「サポニン」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、サポゲニンである親油性アグリコンコアと組み合わせられた1つ以上の親水性グリコン部分を含む両親媒性グリコシドの基を指す。サポニンは、天然に存在してもよいし、合成的（すなわち、天然に存在しない）であってもよい。用語「サポニン」は、天然に存在するサポニン、天然に存在するサポニンの誘導体並びに化学的及び／又は生物工学的合成経路を介して新規に合成されるサポニンを含む。

【0029】

用語「サポニン誘導体」（「修飾されたサポニン」としても知られる）は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、官能基の酸化、官能基の還元及び／又は別の分子との共有結合の形成（「コンジュゲーション」又は「共有結合性のコンジュゲーション」とも称される）などの1つ以上の化学修飾によって誘導体化されている天然に存在するサポニンに対応する化合物を指す。好ましい修飾は、アグリコンのアルデヒド基の；糖鎖のカルボキシル基の又は糖鎖のアセトキシ基の誘導体化を含む。通常、サポニン誘導体は、天然の対応物を有さず、すなわち、サポニン誘導体は、例えば、植物又は木によって天然に生成されない。用語「サポニン誘導体」は、天然に存在するサポニンの誘導体化によって得られる誘導体並びに1つ以上の化学修飾によって誘導体化されている天然に存在するサポニンに対応する化合物をもたらし化学的及び／又は生物工学的合成経路を介して新規に合成される誘導体を含む。

10

【0030】

用語「アグリコンコア構造」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、1つ又は2つの炭水化物アンテナ又はそれに結合される糖鎖（グリカン）を有しないサポニンのアグリコンコアを指す。例えば、キラ酸は、S O 1 8 6 1、Q S - 7 及び Q S 2 1 に関するアグリコンコア構造である。通常、サポニンのグリカンは、直鎖状又は分岐状グリカンなどの単糖又はオリゴ糖である。

20

【0031】

用語「糖鎖」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、グリカン、炭水化物アンテナ、単糖部分（単糖）又は複数の糖部分を含む鎖（オリゴ糖、多糖）のいずれかを指す。糖鎖は、糖部分のみからなる場合があるか又は例えば、O S - 2 1 中に存在するものなどの4 E - メトキシケイ皮酸、4 Z - メトキシケイ皮酸、及び5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸) のいずれか1つなどのさらなる部分を含んでもよい。

30

【0032】

糖鎖の名称に関連して用語「A p i / X y l -」又は「A p i - 又は X y l -」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、アピオース (A p i) 部分を含むか、又はキシロース (X y l) 部分を含む糖鎖を指す。

【0033】

用語「修飾されたサポニンに基づくサポニン」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、修飾されたサポニンをもたらしするために修飾されているサポニンを指す。通常、修飾されたサポニンに基づくサポニンは、天然に存在するサポニンであり、修飾されたサポニンをもたらしするために化学修飾にかけられる。

40

【0034】

用語「サポニンに基づく修飾されたサポニン」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、修飾されたサポニンがもたらされるように化学修飾工程にかけられたサポニンを指し、修飾されたサポニンが作製されたサポニンは通常、天然に存在するサポニンである。

【0035】

用語「オリゴヌクレオチド」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、とりわけ、B N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O)、短い又は低分子干渉RNA (s i R N A ; サイレンシングRNA)、アンチセンスDNA、アンチセンスRNAなどの一本鎖分子又は二本鎖分子として提示されるDNA、修飾されたDNA、RNA、m R N

50

A、修飾されたRNA、合成核酸を包含する核酸の任意の天然の又は合成的な連なりを指す。

【0036】

用語「抗体-薬物コンジュゲート」又は「ADC」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、IgG、Fab、scFv、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、1つ又は複数のV_Hドメイン、単ドメイン抗体、V_{HH}、ラクダ類V_Hなどの抗体の任意のコンジュゲート、並びに活性な医薬成分、毒素、オリゴヌクレオチド、酵素、小分子薬物化合物などの、ヒト患者などの対象の細胞と接触されるときに治療効果を発揮することができる任意の分子を指す。

【0037】

用語「抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート」又は「AOC」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、IgG、Fab、scFv、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、1つ又は複数のV_Hドメイン、単ドメイン抗体、V_{HH}、ラクダ類V_Hなどの抗体の任意のコンジュゲート、並びにBNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、短い又は低分子干渉RNA(sRNA;サイレンシングRNA)、アンチセンスDNA、アンチセンスRNAなどの一本鎖分子又は二本鎖分子として提示されるDNA、修飾されたDNA、RNA、mRNA、修飾されたRNA、合成核酸を包含する核酸の天然の又は合成的な連なりから選択されるオリゴヌクレオチドなどのヒト患者などの対象の細胞と接触されるときに治療効果を発揮することができる任意のオリゴヌクレオチド分子を指す。

【0038】

用語「架橋核酸」、若しくは要するに「BNA」、又は「ロックド核酸」若しくは要するに「LNA」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、修飾されたRNAヌクレオチドを指す。BNAはまた、「束縛されたRNA分子」又は「接近し難いRNA分子」と称される。BNA単量体は、「固定された」C₃'-エンド糖パッキングを有する5員、6員又は7員架橋構造を含有し得る。架橋は、リボースの2', 4'-位で合成的に組み込まれて、2', 4'-BNA単量体をもたらす。BNA単量体は、当技術分野で知られる標準的なホスホラミダイト化学反応を使用してオリゴヌクレオチドポリマー構造に組み込まれ得る。BNAは、結合親和性及び安定性の増大を有する構造的に強固なオリゴヌクレオチドである。

【0039】

リンカーを含む抗体-サポニンコンジュゲートなどにおいて使用される場合の用語「S」は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームにおいて、したがって、弱酸性条件(pH<6.6、例えば、pH4.0~5.5)下で未変化なままである「安定なリンカー」を表す。

【0040】

リンカーを含む抗体-サポニンコンジュゲートなどにおいて使用される場合の用語「L」は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームにおける弱酸性条件(pH<6.6、例えば、pH4.0~5.5)下で切断される「不安定なリンカー」を表す。

【0041】

明細書及び特許請求の範囲における第1、第2、第3などの用語は、例えば、組成物中の同様の要素、組成物、成分、又は別々の方法工程間で区別するために使用され、必ずしも逐次的な又は時間的な順序を記載するためのものではない。その用語は、適切な状況下で互換性があり、本発明の実施形態は、別段の指定がない限り、本明細書に記載されるか又は図示される順序以外で機能することができる。

【0042】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、別段の指定がない限り、組み合わせ及び協同作用において機能し得る。

【0043】

さらに、様々な実施形態は、「好ましい」又は「例えば (e. g.)」又は「例えば (for example)」又は「特に」などと参照されるが、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明が実施され得る例示的な様式として解釈されことになる。

【0044】

特許請求の範囲で使用される用語「含む」は、例えば、その後に列挙される組成物の要素又は方法工程又は成分に限定されると解釈すべきではなく；ある特定の組成物における他の要素又は方法工程又は成分を排除するものではない。それは、参照されるとおりの記載された特徴、整数、(方法)工程又は構成成分の存在を指定するものと解釈される必要があるが、1つ以上の他の特徴、整数、工程若しくは構成成分、又はそれらの群の存在又は追加を排除するものではない。したがって、表現「工程A及びBを含む方法」の範囲は、工程A及びBのみからなる方法に限定されるべきではなく、むしろ本発明に関して、方法の列挙された工程はA及びBのみであり、さらに特許請求の範囲は、それらの方法工程の均等物を含むものとして解釈されるべきである。したがって、表現「構成成分A及びBを含む組成物」の範囲は、構成成分A及びBのみからなる組成物に限定されるべきではなく、むしろ本発明に関して、組成物の列挙された構成成分はA及びBのみであり、さらに特許請求の範囲は、それらの構成成分の均等物を含むものとして解釈されるべきである。

【0045】

加えて、ある要素又は構成成分に対する不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(an)」による参照は、文脈から要素又は構成成分が1つしかないことを明確に要求されない限り、2つ以上の要素又は構成成分が存在する可能性を排除するものではない。したがって、不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(an)」は、通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0046】

用語「サポニナムアルBUM (Saponinum album)」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、SA1657及び主にSA1641を含有するギブソフィラ・パニキュラタ (Gypsophila paniculata) 及びギブソフィラ・アロスティ (Gypsophila arostii) 由来のサポニン含有するMerck KGaA (Darmstadt, Germany) によって製造されるサポニンの混合物を指す。

【0047】

用語「キラヤサポニン」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、キラヤ・サポナリア (Quillaja saponaria) のサポニン画分、したがって、主にQS-18及びQS-21を含有する全ての他のQSサポニンのための供給源を指す。

【0048】

「QS-21」又は「QS21」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 A-apio (約63%)、QS-21 A-xylo (約32%)、QS-21 B-apio (約3.3%)、及びQS-21 B-xylo (約1.7%) の混合物を指す。

【0049】

同様に、「QS-21A」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 A-apio (約65%) 及びQS-21 A-xylo (約35%) の混合物を指す。

【0050】

同様に、「QS-21B」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 B-apio (約65%) 及びQS-21 B-xylo (約35%) の混合物を指す。

【0051】

用語「Quil-A」は、キラヤ・サポナリア (Quillaja saponaria) 由来の市販されている半精製抽出物を指し、可変量の50種を超える異なるサポニン含有し、その多くは、QS-7、QS-17、QS18及びQS-21に見出されるトリテルペン三糖の部分構造Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-をC-3β-OH基で組み込んでいる。Quil-Aに見出されるサポニンは、van

Setten (1995)、表2 [Dirk C. van Setten, Gerrit van de Werken, Gijsbert Zomer and Gideon F. A. Kersten, Glycosyl Compositions and Structural Characteristics of the Potential Immuno-adjutant Active Saponins in the Quillaja saponaria Molina Extract Quil A, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 9, 660-666 (1995)] において列挙される。Quil-A及びキラヤサポニンもまた、キラヤ・サポナリア (Quillaja saponaria) 由来のサポニンの画分であり、両方が、大部分は重複している含量を有して多種多様の異なるサポニンを含有する。2つの画分は、2つの画分が異なる精製手順によって得られるため、その具体的な組成が異なる。

10

【0052】

用語「QS1861」及び用語「QS1862」は、QS-7及びQS-7 apiを指す。QS1861は、1861ダルトンの分子質量を有し、QS1862は、1862ダルトンの分子質量を有する。QS1862は、Fleck et al. (2019) 表1、列番号28において記載される [Juliane Deise Fleck, Andresa Heemann Betti, Francini Pereira da Silva, Eduardo Artur Troian, Cristina Olivaro, Fernando Ferreira and Simone Gasparin Verza, Saponins from Quillaja saponaria and Quillaja brasiliensis: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities, Molecules 2019, 24, 171; doi:10.3390/molecules24010171]。記載された構造は、QS-7のapi-バリエーションQS1862である。分子質量は、この質量がグルクロン酸でプロトンを含む正式な質量であるため、1862ダルトンである。中性pHでは、分子は脱プロトン化される。陰イオンモードの質量分析において測定するとき、測定される質量は1861ダルトンである。

20

【図面の簡単な説明】

【0053】

30

【図1a】 (図1A) : 標的化された2構成成分のアプローチ (1標的)。SO1861及び毒素 (例えば、リボソーム不活性化タンパク質) はそれぞれ、標的細胞への送達及び内部移行のためにV_{HH}又は抗体 (mAb) に別々にコンジュゲートされる。1) mAb-毒素及びV_{HH}-SO1861が、細胞表面受容体に結合し、2) 両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し (受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート/受容体複合体の内部移行が続く)、3) 低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4) 細胞質への毒素の放出が発生し、5) 毒素が細胞死を誘導する。 (図1B) : 標的化された2構成成分のアプローチ (2標的)。SO1861及び毒素 (リボソーム不活性化タンパク質) はそれぞれ、標的細胞への送達及び内部移行のためにV_{HH}又は抗体 (mAb) に別々にコンジュゲートされる。1) mAb-毒素及びV_{HH}-SO1861が、それらの対応する細胞表面受容体に結合し、2) 両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し (受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート/受容体複合体の内部移行が続く)、3) 低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4) 細胞質への毒素の放出が発生し、5) 毒素が細胞死を誘導する。

40

【図1b】 (図1C) : 標的化された2構成成分のアプローチ (2標的)。SO1861及び毒素 (リボソーム不活性化タンパク質) はそれぞれ、標的細胞への送達及び内部移行のためにV_{HH}に別々にコンジュゲートされる。1) V_{HH}-毒素及びV_{HH}-SO1861が、それらの対応する細胞表面受容体に結合し、2) 両方のコンジュゲートの受容体媒

50

介性エンドサイトーシスが発生し（受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）、3）低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4）細胞質への毒素の放出が発生し、5）毒素が細胞死を誘導する。（図1D）：標的化された2構成成分のアプローチ（2標的）。SO1861及び毒素（リボソーム不活性化タンパク質）はそれぞれ、標的細胞への送達及び内部移行のためにV_{HH}又はmAbに別々にコンジュゲートされる。1）V_{HH}-毒素及びmAb-SO1861が、それらの対応する細胞表面受容体に結合し、2）両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し（受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）、3）低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4）細胞質への毒素の放出が発生し、5）毒素が細胞死を誘導する。

10

【図1c】（図1E）：標的化された2構成成分のアプローチ（1標的）。SO1861及び毒素（リボソーム不活性化タンパク質）はそれぞれ、標的細胞への送達及び内部移行のためにV_{HH}又は抗体（mAb）に別々にコンジュゲートされる。1）V_{HH}-毒素及びmAb-SO1861が、細胞表面受容体に結合し、2）両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し（受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）、3）低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4）細胞質への毒素の放出が発生し、5）毒素が細胞死を誘導する。（図1F）：本発明の例示的な分子及びコンジュゲートを示す模式図。抗体の軽鎖に結合された4つのサポニン分子「S」と共有結合的にコンジュゲートされ、及び抗体の重鎖の定常ドメインに共有結合されるエフェクター分子「E」を有するIgG抗体が示される。

20

【図1d】（図1G）：本発明の例示的な分子及びコンジュゲートを示す模式図。4つの三価リンカー（各リンカーは、サポニンに共有結合され、エフェクター分子に共有結合される）と共有結合的にコンジュゲートされたIgG抗体が示される。三価リンカーは、抗体軽鎖に共有結合される。（図1H）：本発明の例示的な分子及びコンジュゲートを示す模式図。2つの三価リンカー（各リンカーは、サポニンに共有結合され、エフェクター分子に共有結合される）と共有結合的にコンジュゲートされた単一ドメイン抗体が示される。（図1I）：本発明の例示的な分子及びコンジュゲートを示す模式図。三価リンカー（三価リンカーは、サポニンに共有結合され、エフェクター分子に共有結合される）と共有結合的にコンジュゲートされた単一ドメイン抗体が示される。

30

【図1e】（図1J）：（S）_n-（L）（E）の概念：mAb-（SO1861）ⁿ（タンパク質毒素）^m。システイン残基（Cys）で共有結合的に連結されたSO1861及びリジン残基のタンパク質毒素（リボソーム不活性化タンパク質）の両方が、標的細胞への送達及び内部移行のために同じ抗体（mAb）にコンジュゲートされる。1）mAb-（Cys-L-SO1861）⁴（Lys-タンパク質毒素）²が、その対応する細胞表面受容体に結合し、2）コンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し（受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）、3）低いエンドリソソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4）細胞質への毒素の放出が発生し、5）毒素が細胞死を誘導する。

40

【図1f】（図1K）：（S）_n-（L）（E）の概念：mAb-（SO1861）ⁿ（アンチセンスBNAオリゴ）^m。システイン残基（Cys）に結合されたSO1861及びリジン残基に結合されたアンチセンスBNAオリゴヌクレオチドの両方が、標的細胞への送達及び内部移行のために同じ抗体（mAb）にコンジュゲートされる。1）mAb-（Cys-SO1861）⁴（Lys-BNAオリゴ）²が、その対応する細胞表面受容体に結合し、2）両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し（受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）、3）低いエンドソーム、リソソーム及びエンドリソソームpH並びに適切な濃度で、

50

SO1861が、エンドソーム、リソソーム及びエンドリソソーム脱出が可能になるように活性になり、4) 細胞質へのBNAオリゴの放出が発生し、5) 標的遺伝子サイレンシングが誘導される。

【図1g】(図1L) : (S) n - (L) (E) の概念 : mAb - (SO1861 - 足場 - アンチセンスBNAオリゴ)ⁿ。(SO1861 - 三官能性リンカー - BNAオリゴ)ⁿは、標的細胞への送達及び内部移行のための抗体(mAb)にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、IgG、又はV_{HH}などのsdAbである。1) mAb - (SO1861 - 三官能性リンカー - BNAオリゴ)⁴が、その対応する細胞表面受容体に結合し、2) 両方のコンジュゲートの受容体媒介性エンドサイトーシスが発生し(受容体へのコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート/受容体複合体の内部移行が続く)、3) 低いエンドソームpH及び適切な濃度で、SO1861が、エンドソーム脱出が可能になるように活性になり、4) 細胞質へのBNAオリゴの放出が発生し、5) 標的遺伝子サイレンシングが誘導される。本発明のコンジュゲートに関連して用語「足場」は、サポニン分子及び/又はタンパク質毒素若しくはオリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子などの1つ又は複数のさらなる分子に共有結合するための1つ又は複数の化学基を有し、及びIgG又はsdAbなどの抗体などのタンパク質に共有結合的にカップリングするための少なくとも1つの化学基を有するオリゴマー分子又はポリマー分子として理解されることになる。

【図2】(図2) : SK-BR-3細胞(HER2⁺⁺/CD71⁺) (A) 及びMD-MB-468細胞(HER2⁻/CD71⁺) (B) に対するV_{HH}(HER2) - SO1861(DAR1) + 50 pM トラスツズマブ - サポリン(DAR4) 又は10 pM CD71 mAb - サポリン(DAR4) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図3】(図3) : SK-BR-3細胞(HER2⁺⁺/CD71⁺) (A) 及びMD-MB-468細胞(HER2⁻/CD71⁺) (B) に対するトラスツズマブ - サポリン(DAR4) 又はCD71 - サポリン(DAR4) + 900 nM HER2 V_{HH} - SO1861(DAR1) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図4】(図4) : SK-BR-3細胞(HER2⁺⁺/CD71⁺) (A) 及びMD-MB-468細胞(HER2⁻/CD71⁺) (B) に対するV_{HH}(HER2) - SO1861(DAR1) + 50 pM CD71 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図5】(図5) : SK-BR-3細胞(HER2⁺⁺/CD71⁺) (A) 及びMD-MB-468細胞(HER2⁻/CD71⁺) (B) に対するCD71 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + 900 nM HER2 V_{HH} - SO1861(DAR1) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図6】(図6) : A431細胞(EGFR⁺⁺/HER⁺/CD71⁺) (A) 及びA2058細胞(EGFR⁻/HER⁺/CD71⁺) (B) に対するCD71 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + セツキシマブ - SO1861(DAR4) 又はHER2 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + セツキシマブ - SO1861(DAR4) 又はEGFR V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + セツキシマブ - SO1861(DAR4) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図7】(図7) : SK-BR-3細胞(HER2⁺⁺/EGFR⁺/CD71⁺) (A) 及びMDA-MB-468細胞(HER2⁻/EGFR⁺⁺/CD71⁺) (B) に対するCD71 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + 77 nM セツキシマブ - SO1861(DAR4) 又はHER2 V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + 77 nM セツキシマブ - SO1861(DAR4) 又はEGFR V_{HH} - ジアンチン(DAR1) + 77 nM セツキシマブ - SO1861(DAR4) の本発明による組み合わせ治療による細胞死滅(MTS) アッセイ。

【図8a】(図8) : 腫瘍標的化タンパク質毒素送達は、担腫瘍マウスにおけるインビボでの腫瘍体積の減少及び腫瘍増殖の阻害をもたらす。A) A431担腫瘍マウスにおけるセツキシマブ - (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-S - ジアンチン)²の用量

10

20

30

40

50

漸増（腹腔内、i. p.）は、対照と比較して26日目に腫瘍体積の減少を明らかにしている。B、C）A431担腫瘍マウスにおけるセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-L-ジアンチン）²の（腹腔内、i. p.（B）又は静脈内 i. v.（C））の用量漸増は、対照と比較して腫瘍増殖の減少を明らかにしている。本発明の共有結合性コンジュゲートに関連して用語「Cys-L-」は、システイン側鎖に対する共有結合として理解されることになり、結合は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームに存在するような酸性条件下で不安定であり及び切断可能である。本発明の共有結合性コンジュゲートに関連して用語「Lys-S-」は、リジン側鎖に対する共有結合として理解されることになり、結合は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームに存在するような酸性条件下で安定であり及び切断不可能である。

10

【図8b】（図8）：腫瘍標的化タンパク質毒素送達は、担腫瘍マウスにおけるインビボでの腫瘍体積の減少及び腫瘍増殖の阻害をもたらす。A）A431担腫瘍マウスにおけるセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-S-ジアンチン）²の用量漸増（腹腔内、i. p.）は、対照と比較して26日目に腫瘍体積の減少を明らかにしている。B、C）A431担腫瘍マウスにおけるセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-L-ジアンチン）²の（腹腔内、i. p.（B）又は静脈内 i. v.（C））の用量漸増は、対照と比較して腫瘍増殖の減少を明らかにしている。本発明の共有結合性コンジュゲートに関連して用語「Cys-L-」は、システイン側鎖に対する共有結合として理解されることになり、結合は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームに存在するような酸性条件下で不安定であり及び切断可能である。本発明の共有結合性コンジュゲートに関連して用語「Lys-S-」は、リジン側鎖に対する共有結合として理解されることになり、結合は、ヒト腫瘍細胞などのヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソームに存在するような酸性条件下で安定であり及び切断不可能である。

20

【図9】（図9）：担腫瘍マウスにおける腫瘍標的化アンチセンスBNAオリゴヌクレオチド送達及び遺伝子サイレンシング。A431担腫瘍マウスにおける30mg/kg セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-L-HSP27BNA）^{1,8}は、対照と比較して、効率的な腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシングを誘導したことを明らかにしている。

30

【図10】（図10）：担腫瘍マウスにおける腫瘍標的化アンチセンスBNAオリゴヌクレオチド送達及び遺伝子サイレンシング。A431担腫瘍マウスにおける30mg/kg セツキシマブー-Cys-（SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA）^{3,7}は、対照と比較して、効率的な腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシングを誘導したことを明らかにしている。

【図11a】（図11）：癌細胞（腫瘍細胞）においてHER2又はEGFR標的化タンパク質毒素送達及び細胞死滅。A、B）SK-BR-3細胞（HER2⁺⁺）及びMDA-MB-468細胞（HER2⁻）に対するトラスツズマブー（Cys-L-SO1861）^{3,8}（Lys-L-ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブー（Cys-L-SO1861）^{3,8}（Lys-S-ジアンチン）^{1,7}治療及び対照。注釈：図11Bに関する凡例はまた、図11Aにおけるグラフに関する。C、D）A431細胞（EGFR⁺⁺）及びA2058細胞（EGFR⁻）に対するセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-L-ジアンチン）^{2,0}又はセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,9}（Lys-S-ジアンチン）^{2,0}治療及び対照。注釈：図11Dに関する凡例はまた、図11Cにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ（FACS分析により決定される）については、表A2を参照されたい。

40

【図11b】（図11）：癌細胞（腫瘍細胞）においてHER2又はEGFR標的化タンパク質毒素送達及び細胞死滅。A、B）SK-BR-3細胞（HER2⁺⁺）及びMDA-MB-468細胞（HER2⁻）に対するトラスツズマブー（Cys-L-SO1861）^{3,8}（Lys-L-ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブー（Cys-L-SO1

50

861)^{3, 8} (Lys-S-ジアンチン)^{1, 7} 治療及び対照。注釈：図11Bに関する凡例はまた、図11Aにおけるグラフに関する。C、D) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-L-ジアンチン)^{2, 0} 又はセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-S-ジアンチン)^{2, 0} 治療及び対照。注釈：図11Dに関する凡例はまた、図11Cにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図11c】 (図11)：癌細胞 (腫瘍細胞) においてHER2又はEGFR標的化タンパク質毒素送達及び細胞死滅。A、B) SK-BR-3細胞 (HER2⁺⁺) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2⁻) に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-L-ジアンチン)^{1, 7} 又はトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-S-ジアンチン)^{1, 7} 治療及び対照。注釈：図11Bに関する凡例はまた、図11Aにおけるグラフに関する。C、D) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-L-ジアンチン)^{2, 0} 又はセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-S-ジアンチン)^{2, 0} 治療及び対照。注釈：図11Dに関する凡例はまた、図11Cにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図11d】 (図11)：癌細胞 (腫瘍細胞) においてHER2又はEGFR標的化タンパク質毒素送達及び細胞死滅。A、B) SK-BR-3細胞 (HER2⁺⁺) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2⁻) に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-L-ジアンチン)^{1, 7} 又はトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-S-ジアンチン)^{1, 7} 治療及び対照。注釈：図11Bに関する凡例はまた、図11Aにおけるグラフに関する。C、D) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-L-ジアンチン)^{2, 0} 又はセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 9} (Lys-S-ジアンチン)^{2, 0} 治療及び対照。注釈：図11Dに関する凡例はまた、図11Cにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図12a】 (図12)：本発明による癌細胞におけるEGFR標的化アンチセンスBNAオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。A、B) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3, 8} 治療及び対照。注釈：図12Bに関する凡例はまた、図12Aにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図12b】 (図12)：本発明による癌細胞におけるEGFR標的化アンチセンスBNAオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。A、B) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3, 8} 治療及び対照。注釈：図12Bに関する凡例はまた、図12Aにおけるグラフに関する。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図13】 (図13)：癌細胞におけるHER2標的化アンチセンスBNAオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。SK-BR-3細胞 (HER2⁺⁺) に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3, 5} 治療及び対照。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (FACS分析により決定される) については、表A2を参照されたい。

【図14】 (図14)：癌細胞におけるEGFR標的化アンチセンスBNAオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。A、B) A431細胞 (EGFR⁺⁺) 及びA2058細胞 (EGFR⁻) に対するセツキシマブー Cys- (SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3, 7} 治療及び対照。注釈：各細胞株の標的受容体発現データ (F

10

20

30

40

50

A C S 分析により決定される) については、表 A 2 を参照されたい。

【図 1 5 a】 (図 1 5) : 1 - 標的 2 - 構成成分 (E G F R 高発現)。治療的組み合わせによる A 4 3 1 (E G F R⁺⁺⁺) 及び C a S K i (E G F R⁺⁺) における E G F R 標的化細胞死滅。A、B) 1 0 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブー S O 1 8 6 1 滴定は、コンジュゲートされた S O 1 8 6 1 の 1 0 0 ~ 4 0 0 倍低下された濃度が、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 に対して必要となることを示す。C、D) 2 7 8 n M セツキシマブー S O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、3 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 + セツキシマブーサポリンと対照的に細胞を死滅させる。1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 + セツキシマブーサポリンは、両方のセツキシマブコンジュゲートが同じ E G F R 受容体について競合するため、治療的組み合わせと比較してより効率的である。両方のセツキシマブコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。注釈：図 1 5 B に示される凡例はまた、図 1 5 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 5 D に示される凡例はまた、図 1 5 C におけるグラフに関する。

10

【図 1 5 b】 (図 1 5) : 1 - 標的 2 - 構成成分 (E G F R 高発現)。治療的組み合わせによる A 4 3 1 (E G F R⁺⁺⁺) 及び C a S K i (E G F R⁺⁺) における E G F R 標的化細胞死滅。A、B) 1 0 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブー S O 1 8 6 1 滴定は、コンジュゲートされた S O 1 8 6 1 の 1 0 0 ~ 4 0 0 倍低下された濃度が、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 に対して必要となることを示す。C、D) 2 7 8 n M セツキシマブー S O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、3 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 + セツキシマブーサポリンと対照的に細胞を死滅させる。1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 + セツキシマブーサポリンは、両方のセツキシマブコンジュゲートが同じ E G F R 受容体について競合するため、治療的組み合わせと比較してより効率的である。両方のセツキシマブコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。注釈：図 1 5 B に示される凡例はまた、図 1 5 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 5 D に示される凡例はまた、図 1 5 C におけるグラフに関する。

20

30

【図 1 6 a】 (図 1 6) : 1 - 標的 2 - 構成成分 (E G F R 発現なし / 低発現)。治療的組み合わせによる H e L a (E G F R⁺) 及び A 2 0 5 8 (E G F R⁻) 細胞における E G F R 標的化細胞死滅。A、B) 1 0 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブー S O 1 8 6 1 滴点は、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D) 2 7 8 n M セツキシマブー S O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 E G F R 受容体発現は、十分な S O 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的であるが、1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 は細胞死滅を誘導する。注釈：図 1 6 B に示される凡例はまた、図 1 6 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 6 D に示される凡例はまた、図 1 6 C におけるグラフに関する。

40

【図 1 6 b】 (図 1 6) : 1 - 標的 2 - 構成成分 (E G F R 発現なし / 低発現)。治療的組み合わせによる H e L a (E G F R⁺) 及び A 2 0 5 8 (E G F R⁻) 細胞における E G F R 標的化細胞死滅。A、B) 1 0 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブー S O 1 8 6 1 滴点は、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D) 2 7 8 n M セツキシマブー S O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 E G F R 受容体発現は、十分な S O 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的であるが、1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 は細胞死滅を誘導する。注釈：図 1 6 B に示される凡例はまた、図 1 6 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 6 D に示される

50

凡例はまた、図 1 6 C におけるグラフに関する。

【図 1 7】（図 1 7）：1-標的 2-構成成分（HER 2 高発現）。治療的組み合わせによる SKBR 3（HER 2⁺⁺⁺）細胞における HER 2 標的化細胞死滅。A）6 7 3 pM トラスツズマブ-サポリンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブ-SO 1 8 6 1 滴定は、コンジュゲートされた SO 1 8 6 1 の 1 0 0 0 倍低下された濃度が、トラスツズマブ-サポリンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 に対して必要となることを示す。C、D）9. 4 nM トラスツズマブ-SO 1 8 6 1 と組み合わせたトラスツズマブ-サポリン滴定は、1 0 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 + トラスツズマブ-サポリンと対照的に細胞を死滅させる。1 0 7 5 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 + トラスツズマブ-サポリンは、両方のトラスツズマブコンジュゲートが同じ HER 2 受容体について競合するため、治療的組み合わせと比較してより効率的である。両方のトラスツズマブコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。SPT 0 0 1 は、SO 1 8 6 1 である。

【図 1 8 a】（図 1 8）：1-標的 2-構成成分（HER 2 発現なし／低発現）。治療的組み合わせによる JIMT 1（HER 2⁺）及び A 4 3 1（HER 2^{+/}）細胞における HER 2 標的化細胞死滅。A、B）5 0 pM トラスツズマブ-サポリンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブ-SO 1 8 6 1 滴定は、トラスツズマブ-サポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）1 0 nM トラスツズマブ-SO 1 8 6 1 と組み合わせたトラスツズマブ-サポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 HER 2 受容体発現は、十分な SO 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的であるが、1 5 0 0 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 は効率的な細胞死滅を誘導する。注釈：図 1 8 B に示される凡例はまた、図 1 8 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 8 D に示される凡例はまた、図 1 8 C におけるグラフに関する。SPT 0 0 1 は、SO 1 8 6 1 である。

【図 1 8 b】（図 1 8）：1-標的 2-構成成分（HER 2 発現なし／低発現）。治療的組み合わせによる JIMT 1（HER 2⁺）及び A 4 3 1（HER 2^{+/}）細胞における HER 2 標的化細胞死滅。A、B）5 0 pM トラスツズマブ-サポリンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブ-SO 1 8 6 1 滴定は、トラスツズマブ-サポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）1 0 nM トラスツズマブ-SO 1 8 6 1 と組み合わせたトラスツズマブ-サポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 HER 2 受容体発現は、十分な SO 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的であるが、1 5 0 0 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 は効率的な細胞死滅を誘導する。注釈：図 1 8 B に示される凡例はまた、図 1 8 A におけるグラフに関する。注釈：図 1 8 D に示される凡例はまた、図 1 8 C におけるグラフに関する。SPT 0 0 1 は、SO 1 8 6 1 である。

【図 1 9 a】（図 1 9）：2-標的 2-構成成分（EGFR 高発現及び HER 2 低発現）。治療的組み合わせによる A 4 3 1（EGFR⁺⁺⁺／HER 2^{+/}）及び Caski（EGFR⁺⁺⁺／HER 2^{+/}）細胞における EGFR／HER 2 標的化細胞死滅。A、B）5 0 pM トラスツズマブ-サポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブ-SO 1 8 6 1 滴定は、コンジュゲートされた SO 1 8 6 1 の 1 0 0 倍低下された濃度が、トラスツズマブ-サポリンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 に対して必要となることを示す。C、D）2 7 8 nM セツキシマブ-SO 1 8 6 1 と組み合わせたトラスツズマブ-サポリン滴定は、3 0 0 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 + トラスツズマブ-サポリンと対照的に細胞を死滅させる。1 5 0 0 nM のコンジュゲートされていない SO 1 8 6 1 + トラスツズマブ-サポリンは、両方のコンジュゲートが同じ受容体について競合しないため、治療的組み合わせ、2 7 8 nM セツキシマブ-SO 1 8 6 1 + トラスツズマブ-サポリンと比較して同等の細胞死滅効率を有する。両方のコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。注釈：図 1

9 Bに示される凡例はまた、図19 Aにおけるグラフに関する。注釈：図19 Dに示される凡例はまた、図19 Cにおけるグラフに関する。SPT001は、SO1861である。

【図19 b】（図19）：2-標的2-構成成分（EGFR高発現及びHER2低発現）。治療的組み合わせによるA431（EGFR⁺⁺⁺/HER2⁺/−）及びCaski（EGFR⁺⁺/HER2⁺/−）細胞におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブーSO1861滴定は、コンジュゲートされたSO1861の100倍低下された濃度が、トラスツズマブーサポリンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていないSO1861に対して必要となることを示す。C、D）278 nM セツキシマブーSO1861と組み合わせたトラスツズマブーサポリン滴定は、300 nMのコンジュゲートされていないSO1861+トラスツズマブーサポリンと対照的に細胞を死滅させる。1500 nMのコンジュゲートされていないSO1861+トラスツズマブーサポリンは、両方のコンジュゲートが同じ受容体について競合しないため、治療的組み合わせ、278 nM セツキシマブーSO1861+トラスツズマブーサポリンと比較して同等の細胞死滅効率を有する。両方のコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。注釈：図19 Bに示される凡例はまた、図19 Aにおけるグラフに関する。注釈：図19 Dに示される凡例はまた、図19 Cにおけるグラフに関する。SPT001は、SO1861である。

【図20 a】（図20）：2-標的2-構成成分（EGFR低発現及びHER2発現なし/低発現）。治療的組み合わせによるHeLa（EGFR⁺/HER2⁺/−）及びA2058（EGFR[−]/HER2⁺/−）細胞におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブーSO1861滴定は、トラスツズマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）278 nM セツキシマブーSO1861と組み合わせたトラスツズマブーサポリン滴定は、細胞死滅を増強しないが、1500 nMのコンジュゲートされていないSO1861は、効率的な細胞の死滅を誘導する。低EGFR受容体発現は、十分なSO1861が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的である。注釈：図20 Bに示される凡例はまた、図20 Aにおけるグラフに関する。注釈：図20 Dに示される凡例はまた、図20 Cにおけるグラフに関する。SPT001は、SO1861である。

【図20 b】（図20）：2-標的2-構成成分（EGFR低発現及びHER2発現なし/低発現）。治療的組み合わせによるHeLa（EGFR⁺/HER2⁺/−）及びA2058（EGFR[−]/HER2⁺/−）細胞におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたセツキシマブーSO1861滴定は、トラスツズマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）278 nM セツキシマブーSO1861と組み合わせたトラスツズマブーサポリン滴定は、細胞死滅を増強しないが、1500 nMのコンジュゲートされていないSO1861は、効率的な細胞の死滅を誘導する。低EGFR受容体発現は、十分なSO1861が抗体媒介性送達を介して送達されることに禁制的である。注釈：図20 Bに示される凡例はまた、図20 Aにおけるグラフに関する。注釈：図20 Dに示される凡例はまた、図20 Cにおけるグラフに関する。SPT001は、SO1861である。

【図21】（図21）：2-標的2-構成成分（HER2高発現及びEGFR低発現）。治療的組み合わせによるSKBR3（HER2⁺⁺⁺/EGFR⁺/−）細胞におけるHER2標的化細胞死滅。A）1.5 pM EGFジアンチンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブーSO1861滴定は、コンジュゲートされたSO1861の400倍低下された濃度が、EGFジアンチンによる細胞死滅を誘導するために、コンジュゲートされていないSO1861に対して必要となることを示す。B）9.4 nM トラスツズマブーSO1861と組み合わせたEGFジアンチン滴定は、10 nMのコンジュゲートされていないSO1861+EGFジアンチンと対照的に細胞を死滅させることができる。1075 nMのコンジュゲートされていないSO1861+EGFジアンチンは、両方のコンジュゲートが同じ受容体について競合しないため、治療的組み合わせ、9.4 nM

トラスツズマブーS O 1 8 6 1 + E G F ジアンチンと比較して同等の細胞死滅効率を有する。両方のコンジュゲートの同時に標的化される送達のみが、いずれかのコンジュゲート単独による単剤療法と対照的に効率的な細胞死滅をもたらす。S P T 0 0 1 は、S O 1 8 6 1 である。

【図 2 2 a】（図 2 2）：2－標的 2－構成成分（H E R 2 低発現及び E G F R 低又は高発現）。本発明による治療的組み合わせによる J I M T 1（H E R 2⁺）及び A 4 3 1（H E R 2⁺/－）細胞における H E R 2 標的化細胞死滅。A、B）5 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブーS O 1 8 6 1 滴定は、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）1 0 n M トラスツズマブーS O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 H E R 2 受容体発現は、十分な S O 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに
10
関して禁制的であるが、1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 は効率的な細胞死滅を誘導する。セツキシマブーサポリンの送達のための高 E G F R 受容体発現レベル（D）でさえ、トラスツズマブーS O 1 8 6 1 の存在下でその効力を変化させず、これは、細胞死滅活性に関するボトルネックが、H E R 2 発現レベルが低すぎて、標的細胞内部での S O 1 8 6 1 が不十分となり、エンドソーム脱出に切り替えることができないことを示している。注釈：図 2 2 B に示される凡例はまた、図 2 2 A におけるグラフに関する。注釈：図 2 2 D に示される凡例はまた、図 2 2 C におけるグラフに関する。S P T 0 0 1 は、S O 1 8 6 1 である。

【図 2 2 b】（図 2 2）：2－標的 2－構成成分（H E R 2 低発現及び E G F R 低又は高発現）。本発明による治療的組み合わせによる J I M T 1（H E R 2⁺）及び A 4 3 1（H E R 2⁺/－）細胞における H E R 2 標的化細胞死滅。A、B）5 p M セツキシマブーサポリンの固定された濃度と組み合わせたトラスツズマブーS O 1 8 6 1 滴定は、セツキシマブーサポリンによる細胞死滅を誘導しない。C、D）1 0 n M トラスツズマブーS O 1 8 6 1 と組み合わせたセツキシマブーサポリン滴定は、細胞死滅を誘導できない。低 H E R 2 受容体発現は、十分な S O 1 8 6 1 が抗体媒介性送達を介して送達されることに
20
関して禁制的であるが、1 5 0 0 n M のコンジュゲートされていない S O 1 8 6 1 は効率的な細胞死滅を誘導する。セツキシマブーサポリンの送達のための高 E G F R 受容体発現レベル（D）でさえ、トラスツズマブーS O 1 8 6 1 の存在下でその効力を変化させず、これは、細胞死滅活性に関するボトルネックが、H E R 2 発現レベルが低すぎて、標的細胞内部での S O 1 8 6 1 が不十分となり、エンドソーム脱出に切り替えることができないことを示している。注釈：図 2 2 B に示される凡例はまた、図 2 2 A におけるグラフに関する。注釈：図 2 2 D に示される凡例はまた、図 2 2 C におけるグラフに関する。S P T 0 0 1 は、S O 1 8 6 1 である。
30

【図 2 3】（図 2 3）：2－標的 2－構成成分対 T－D M 1。高 E G F R 発現及び低 H E R 2 発現を有する細胞（A 4 3 1）は、治療的組み合わせにより効率的に死滅させられるが、T－D M 1 は、そのような低毒性濃度で効果的ではない。T－D M 1 は、トラスツズマブーエムタンシン（K a d c y l a（登録商標））であり、抗体当たり 3．5 個の D M 1 毒素分子を保有する。

【図 2 4 a】（図 2 4 A－E）：トラスツズマブ（図 2 4 A）、セツキシマブ（図 2 4 B）又は T－D M 1（図 2 4 C）、遊離毒素サポリン（図 2 4 D）及びジアンチン（図 2 4 D）、非細胞結合 I g G にカップリングされたサポリン（図 2 4 D）、及び遊離サポニン S O 1 8 6 1 と合わせられた非細胞結合 I g G にカップリングされたサポリン（図 2 4 E）が、指定の細胞株 S K－B R－3、J I M T－1、M D A－M B－4 6 8、A 4 3 1、C a S k i、H e L a、A 2 0 5 8、B T－4 7 4 と接触されときの相対的な細胞生存率を示す。注釈：図 2 4 C に示される凡例はまた、図 2 4 A 及び 2 4 B における曲線に関する。
40

【図 2 4 b】（図 2 4 A－E）：トラスツズマブ（図 2 4 A）、セツキシマブ（図 2 4 B）又は T－D M 1（図 2 4 C）、遊離毒素サポリン（図 2 4 D）及びジアンチン（図 2 4 D）、非細胞結合 I g G にカップリングされたサポリン（図 2 4 D）、及び遊離サポニン
50

SO1861と合わせられた非細胞結合IgGにカップリングされたサポリン（図24E）が、指定の細胞株SK-BR-3、JIMT-1、MDA-MB-468、A431、CaSki、HeLa、A2058、BT-474と接触されるとき相対的な細胞生存率を示す。注釈：図24Cに示される凡例はまた、図24A及び24Bにおける曲線に関する。

【図24c】（図24A-E）：トラスツズマブ（図24A）、セツキシマブ（図24B）又はT-DM1（図24C）、遊離毒素サポリン（図24D）及びジアンチン（図24D）、非細胞結合IgGにカップリングされたサポリン（図24D）、及び遊離サポニンSO1861と合わせられた非細胞結合IgGにカップリングされたサポリン（図24E）が、指定の細胞株SK-BR-3、JIMT-1、MDA-MB-468、A431、CaSki、HeLa、A2058、BT-474と接触されるとき相対的な細胞生存率を示す。注釈：図24Cに示される凡例はまた、図24A及び24Bにおける曲線に関する。

10

【図25】（図25）：1T2Cインビボ活性。A431担腫瘍マウスにおける50mg/kg セツキシマブー（Cys-L-SO1861）⁴+25mg/kg セツキシマブー（-L-HSP27BNA）⁴の1T2Cの組み合わせは、対照と比較して、強力な腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシングを明らかにしている。

【図26】（図26）：1T2Cインビボ活性。PDX腫瘍マウスモデル（高HER2発現）における40mg/kg トラスツズマブー（Cys-L-SO1861）⁴+0.02/0.03mg/kg トラスツズマブーサポリンの1T2Cの組み合わせは、効果的な腫瘍増殖阻害を示す。

20

【図27】（図27）：A431担腫瘍マウスモデルで試験される2T2構成成分系は、腫瘍退縮を明らかにしている。

【図28】（図28）：A431担腫瘍マウスモデルで試験される2T2構成成分系は、腫瘍退縮及び根絶を明らかにしている。

【図29a】（図29）：2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるA431細胞（EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}）（A、C）及びCaSki細胞（EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}）（B、D）におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）A431細胞に対するセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}滴定+固定された濃度の50pM トラスツズマブーサポリン及び対照。C、D）CaSki細胞に対するトラスツズマブーサポリン滴定+固定された濃度の75nM セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}及び対照。凡例及び/又は軸は、A、Bに関して同じであり、凡例は、図C及びDに関して同じである。

30

【図29b】（図29）：2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるA431細胞（EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}）（A、C）及びCaSki細胞（EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}）（B、D）におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）A431細胞に対するセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}滴定+固定された濃度の50pM トラスツズマブーサポリン及び対照。C、D）CaSki細胞に対するトラスツズマブーサポリン滴定+固定された濃度の75nM セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}及び対照。凡例及び/又は軸は、A、Bに関して同じであり、凡例は、図C及びDに関して同じである。

40

【図30a】（図30）：2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるHeLa細胞（EGFR^{+/+}/HER2^{+/-}）（A、C）及びA2058細胞（EGFR⁻/HER2^{+/-}）（B、D）におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B）HeLa細胞に対するセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}滴定+固定された濃度の50pM トラスツズマブーサポリン及び対照。C、D）A2058細胞に対するトラスツズマブーサポリン滴定+固定された濃度の75nM セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3,7}及び対照。凡例及び/又は軸は、C及びDに関して同じである。

。

【図30b】（図30）：2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによる

50

HeLa細胞 (EGFR⁺/−/HER2⁺/−) (A、C) 及びA2058細胞 (EGFR[−]/HER2⁺/−) (B、D) におけるEGFR/HER2標的化細胞死滅。A、B) HeLa細胞に対するセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 7} 滴定+固定された濃度の50 pM トラスツズマブーサポリン及び対照。C、D) A2058細胞に対するトラスツズマブーサポリン滴定+固定された濃度の75 nM セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3, 7} 及び対照。凡例及び/又は軸は、C及びDに関して同じである。

【図31】 (図31) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるSKBR3細胞 (HER2⁺⁺/EGFR⁺/−) (A、B) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A) SKBR3細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の1.5 pM EGFジアンチン及び対照。B) SKBR3細胞に対するEGFジアンチン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。

10

【図32a】 (図32) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるJIMT-1細胞 (HER2⁺/−/EGFR⁺/−) (A、C) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2[−]/EGFR⁺⁺) (B、D) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A、B) JIMT-1細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の1.5 pM EGFジアンチン及び対照。C、D) MDA-MB-468細胞に対するEGFジアンチン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。凡例及び/又は軸は、C及びDに関して同じである。

20

【図32b】 (図32) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるJIMT-1細胞 (HER2⁺/−/EGFR⁺/−) (A、C) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2[−]/EGFR⁺⁺) (B、D) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A、B) JIMT-1細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の1.5 pM EGFジアンチン及び対照。C、D) MDA-MB-468細胞に対するEGFジアンチン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。凡例及び/又は軸は、C及びDに関して同じである。

【図33】 (図33) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるSKBR3細胞 (HER2⁺⁺/EGFR⁺/−) (A、B) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A) SKBR3細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の10 pM セツキシマブーサポリン及び対照。B) SKBR3細胞に対するセツキシマブーサポリン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。

30

【図34a】 (図34) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるJIMT-1細胞 (HER2⁺/−/EGFR⁺/−) (A、C) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2[−]/EGFR⁺⁺) (B、D) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A、B) JIMT-1細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の10 pM セツキシマブーサポリン及び対照。C、D) MDA-MB-468細胞に対するセツキシマブーサポリン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。凡例及び/又は軸は、A、Bに関して同じであり、凡例は、C及びDに関して同じである。

40

【図34b】 (図34) : 2-標的2-構成成分。本発明による治療的組み合わせによるJIMT-1細胞 (HER2⁺/−/EGFR⁺/−) (A、C) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2[−]/EGFR⁺⁺) (B、D) におけるHER2/EGFR標的化細胞死滅。A、B) JIMT-1細胞に対するトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 滴定+固定された濃度の10 pM セツキシマブーサポリン及び対照。C、D) MDA-MB-468細胞に対するセツキシマブーサポリン滴定+固定された濃度の2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び対照。凡例及び/又は軸は、A、

50

Bに関して同じであり、凡例は、C及びDに関して同じである。

【発明を実施するための形態】

【0054】

生理活性分子（例えば、エフェクター分子）が機能するために、分子は、例えば、血清中において、細胞表面の外部又は細胞若しくはオルガネラの内部にあるその標的と結合することが可能である必要がある。ほとんど全てのタンパク質に基づく標的化毒素の活性部分は、例えば、標的細胞の細胞質ゾルに入るか又はその標的調節性の効果を媒介しなければならない。多くの集合において、毒素は、（１）標的化部分が、内部移行が不十分であり、及び細胞の外部に結合されたままであり、（２）内部移行後に細胞表面に戻って再利用されるか又は（３）それが分解されるエンドリソソームに輸送されるため、無効なままである。これらの基本的な問題は、何十年もの間知られており、500を超える標的化毒素が、過去数十年に調査されており、問題はまだ解決されておらず、一対の抗体標的化タンパク質毒素のみが、重篤な毒性に関して警告ラベルを伴ってはいるが市場に承認されている。モキセツモマブパスードトクス-tdfk（LUMOXITI（登録商標）、AstraZeneca Pharmaceuticals LP）は、現在までにFDAによって再発性又は難治性ヘアリー細胞白血病のために承認されている。そのような承認されたADCの他のものは、Elzonris、Ontakである。

10

【0055】

これらの問題を克服するために、小胞体にある生合成経路の細胞内膜輸送複合体に毒素を誘導するアプローチ及びエンドソーム、すなわち、細胞内のエンドサイトーシス経路の区画の膜の完全性を破壊するか又は弱め、それによりエンドソーム脱出を促進する技術を含む多くの戦略が記載されている。これは、リソソーム向性アミン、カルボキシイオノフォア、カルシウムチャネルアンタゴニスト、ウイルス、細菌、植物、動物、ヒト及び合成源の様々な細胞透過性ペプチド、他の有機分子並びに光誘導性の手法の使用を含む。標的化毒素の有効性は通常、細胞培養物中で100又は1000倍、例外的な場合、百万倍を超えて増大されるが、他の物質とエンドソーム脱出エンハンサーを同時投与するための要件は、さらなる副作用、標的特異性の喪失、治療域を決定する難しさ及び細胞型依存的変動を含む新たな問題を抱えている。

20

【0056】

物理化学的手法を含む全ての戦略は、多かれ少なかれ膜と直接的に相互作用し、本質的に小さい化学分子、二次代謝物、ペプチド及びタンパク質を含むエンハンサー分子を必要とする。全てのこれらの物質の共通の特徴は、それら自体が標的細胞特異的でなく、標的化毒素とは異なる動態で分布することである。これは、既存のアプローチの1つの主要な欠陥である。

30

【0057】

本発明の第1の目標は、増加した治療域を有する改良型ADC及びAOCを提供すること、及び、例えば、標的細胞の外部から前記細胞への送達が考慮される場合、又はより具体的には前記標的細胞の細胞質ゾルにおけるエフェクター分子の送達が考慮される場合、エフェクター分子の有効量又は用量の送達のための改良型ADC及びAOCを提供することである。本発明の第2の目標は、エフェクター分子及びリガンドを含むコンジュゲートで治療されることになる疾患に罹患している（ヒト）患者の治療の改善された方法を提供すること、すなわち、例えば、標的腫瘍細胞の細胞質ゾルにおいて送達されることになるエフェクター分子を含むADC又はAOCの治療域を改善することである。

40

【0058】

本発明の目的は、抗癌療法などの療法における使用のためのエフェクター分子活性強化分子及びADC又はAOCの組み合わせであるコンジュゲートを提供することである。本発明のそのようなコンジュゲートの提供によって、ADC又はAOCなどのコンジュゲートの一部であるエフェクター分子の治療域は、効率的に広げられる。

【0059】

上の目的の少なくとも1つは、エフェクター分子活性強化分子をさらに含むコンジュゲ

50

ートである改良型ADC及び改良型AOCを提供することによって達成される。

【0060】

本発明は、特定の実施形態に関して記載されることになるが、本発明は、それに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。本発明は、いくつかの実施形態の点で記載されているが、その代替物、変更形態、並べ換え及び均等物は、明細書を読むとき並びに図面及びグラフの調査時に当業者に明らかであろう。本発明は、図示される実施形態に何ら限定されない。変更は、添付の特許請求の範囲によって定義される範囲から逸脱せずになされ得る。

【0061】

本発明者らは、抗体薬物コンジュゲート又は抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートなどのコンジュゲートの治療域が、コンジュゲートが投与される担腫瘍哺乳動物（マウス）に投与されるとき、前記コンジュゲートが、少なくとも1つの共有結合されたサポニンを含むときに増大することを確立した（例えば、エフェクター分子及び抗体に共有結合されたサポニンの効果の一連のインビトロでの腫瘍細胞及びインビボでの腫瘍モデルの例については実施例の節における図8～14を参照のこと）。サポニンは、抗体並びにタンパク質毒素及びBNAなどのオリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子とコンジュゲートされる。本発明者らは、完全長インタクトIgGなどの抗体、又はV_{HH}などのsdAbなどの細胞表面分子に結合するためのリガンドと本発明のサポニンをコンジュゲートすることが、その細胞表面にある細胞表面分子を露出させる標的細胞の細胞表面でのサポニンの細胞特異的送達、その後の細胞エンドソーム、エンドリソソーム、リソソームなどの細胞内部及び最終的には細胞の細胞質ゾル中へのサポニンの送達のためのコンジュゲートを提供することを最初に確立し、決定した。そのような細胞標的化サポニンコンジュゲートの例は、例えば、本明細書の下の実施例の節において概説されるとおり、サポニン-V_{HH}コンジュゲートに関して図2～5並びに図5～7、15～23、及び25～34において提供される。サポニンは、EGF、Her2標的化V_{HH}又はIgG、EGFR標的化IgGなどのリガンドにコンジュゲートされる。

【0062】

本発明のコンジュゲートにおける細胞表面分子結合分子としてのsdAb又は完全長抗体若しくは異なる免疫グロブリン（Ig）形式を含む本発明のコンジュゲートは、好ましくは、及び全ての例示的な例において、共有結合的に、より好ましくは、（切断可能）リンカーを介してそれに結合された本発明のサポニンなどの少なくとも1つのグリコシドを有する。サポニンは、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、おそらくエフェクター部分の活性が望まれる細胞質ゾルへのエンドソーム脱出を強化することによって、細胞表面分子標的化分子（抗体、sdAb）に結合されたエフェクター部分の治療的有効性を増強する。このようにして、既に、ADC又はAOCの従来用量よりも低いエフェクター分子の用量で、すなわち、本発明のコンジュゲートの低い用量で、サポニンを含むコンジュゲートの存在の影響下で治療効果が確立され、それによってサポニンが標的化される細胞の近傍、標的化される細胞及び／又は標的化される細胞内部に運ばれる。標的化される細胞は、例えば、腫瘍細胞又は自己免疫細胞又はB細胞疾患関連B細胞などの疾患細胞である。エフェクター部分は、例えば、ADCの一部としての毒素又は本発明によるAOCの一部としてのアンチセンスBNAなどのオリゴヌクレオチドである。

【0063】

本発明の第1の態様は、エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞中に移行させるためのコンジュゲートであって、直接的に又は少なくとも1つのリンカーを介して互いに共有結合された、細胞に移行されることになる少なくとも1つのエフェクター分子と、少なくとも1つの単ドメイン抗体（sdAb）と、少なくとも1つのサポニンを含み、少なくとも1つのサポニンが、モノデスマサイドリテルペングリコシドであるか又はバイデスマサイドリテルペングリコシドであり、sdAbが、前記細胞の細胞表面分子に結合することができるコンジュゲートに関する。

【0064】

本発明者らは、キラヤ・サボナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性画分中のサポニンなどのサポニン、QS-21、SA1641、SO1861を、細胞表面分子標的化分子、例えば、抗体、sdAbに、例えば、三官能リンカー、例えば、構造Aの三官能性リンカー（本明細書で下に示される）を介して、又は共有結合したサポニンを含む足場のオリゴマー又はポリマー構造を介して共有結合的にカップリングすることが、コンジュゲート中の共有結合的にカップリングされたサポニンの影響下で本発明のコンジュゲートによって含まれる毒素などのエフェクター部分によって発揮される細胞毒性の向上をもたらすことを本明細書で開示している。

【0065】

したがって、本発明のある態様は、エンドソーム脱出強化分子、すなわち、サポニン、エフェクター部分及び結合分子、例えば、sdAbを含むコンジュゲート、したがって、グリコシド分子及びエフェクター分子が、例えば、エンドソーム脱出強化コンジュゲート中の1つ及び同じ結合分子に結合され、エンドソーム脱出強化コンジュゲートが、標的細胞特異的表面分子又は構造に特異的に結合することができ、それによりコンジュゲート及び標的細胞特異的表面分子の複合体の受容体媒介性エンドサイトーシスを誘導する（受容体に対するコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）コンジュゲートに関する。好ましくは、エンドソーム脱出強化コンジュゲートにおけるサポニン及びエフェクター部分の組み合わせは、前記サポニンによる前記エフェクター部分のエンドソーム脱出の増強を可能にする。そうすることによって、コンジュゲートは、好ましくは、サポニンを伴わずに結合分子及びエフェクター部分を含むADCと比較して、エフェクター分子の効果を向上させる。

【0066】

本発明をより詳細に説明するために、物質の細胞への取り込みのプロセス及び本発明において使用される用語法がまず記載される。小胞出芽による細胞への細胞外物質の取り込みは、エンドサイトーシスと呼ばれる。前記小胞出芽は、（1）細胞質タンパク質クラスリンによって媒介される受容体依存的リガンド取り込み、（2）コレステロール結合タンパク質カベオリンによって媒介される脂質ラフト取り込み、（3）非特異的な液体取り込み（ピノサイトーシス）、又は（4）非特異的な粒子取り込み（食作用）によって特徴付けられ得る。全ての種類のエンドサイトーシスは、小胞輸送の以下の細胞プロセス及びエンドサイトーシス経路と呼ばれる物質ソーティングに行き当たる。エンドサイトーシス経路は、複雑であり、完全には理解されていない。以前は、オルガネラは新規に形成され、エンドサイトーシス経路を経て次のオルガネラに成熟すると考えられていた。現在では、エンドサイトーシス経路は、小胞輸送によって接続される安定した区画を含むという仮説が立てられている。区画は、細胞のための必須の機能の特定のセットに特定化される複雑な多機能性膜オルガネラである。小胞は、組成においてより単純な一過性のオルガネラであるとみなされ、既存の区画から出芽することによって新規に形成する膜に封入された入れ物として定義される。区画と対照的に、小胞は、生理的に不可逆的な一連の生化学的変化である成熟を経てもよい。初期エンドソーム及び後期エンドソームは、エンドサイトーシス経路において安定な区画となるが、初期エンドサイトーシス小胞、ファゴソーム、多胞体（エンドソームキャリア小胞とも呼ばれる）、分泌顆粒、及びリソソームでさえ小胞となる。エンドサイトーシス小胞は、最も顕著にクラスリン被覆小窩から細胞膜に生じ、まず初期エンドソームと融合し、およそpH6.5の主要なソーティング区画である。内部移行されたカーゴ及び膜の大部分は、リサイクリング小胞（リサイクリング経路）を介して細胞膜に戻って再利用される。分解されるべき構成成分は、多胞体を介して酸性の後期エンドソーム（6未満のpH）に輸送される。リソソームは、成熟リソソーム酵素を構築し、必要な場合にそれらを後期エンドソーム区画に送達することができる小胞である。得られたオルガネラは、ハイブリッドオルガネラ又はエンドリソソームと呼ばれる。リソソームは、リソソーム再編成と称されるプロセスにおいてハイブリッドオルガネラを出芽する。後期エンドソーム、リソソーム、及びハイブリッドオルガネラは、非常に動的なオルガネラであり、その間の区別は難しい場合が多い。形質膜陥入した分子の分解は、エン

10

20

30

40

50

ドリソソーム内部で起こる。エンドソーム脱出は、エンドサイトーシス経路、好ましくは、クラスリン媒介性エンドサイトーシス、又はリサイクリング経路に由来するあらゆる種類の区画又は小胞の内腔から、物質が能動的又は受動的に細胞質に放出されることである。したがって、エンドソーム脱出は、中間体及びハイブリッドオルガネラを含む、エンドソーム、エンドリソソーム又はリソソームからの放出を含むが、これらに限定されない。細胞質ゾルに入った後、前記物質は、核などの他の細胞単位に移動する可能性がある。本発明に関連してグリコシド分子（サポニン）は、エフェクター分子の効果を、特に、エンドソーム脱出を促進することによって強化することができる化合物である。グリコシド分子は、エンドサイトーシス経路及びリサイクリング経路の区画及び小胞の膜と相互作用し、それらを前記エフェクター分子が漏れるようにして、エンドソーム脱出の増強をもたらす。

10

【0067】

用語「エフェクター分子の効果を改善すること」は、サポニンが、好ましくは、その標的結合を可能にするか又は向上させることによって、エフェクター分子の機能的有効性（例えば、毒素又は薬物の治療指数；生物工学的プロセスにおける修飾因子の代謝有効性；細胞培養調査実験における遺伝子のトランスフェクションの有効性）を増大させることを意味する。抗原特異的免疫応答の加速、延長、又は強化は含まれないことが好ましい。治療的有效性は、より少ない投与及び／又はより少ない副作用を伴うより強力な治療効果を含むが、これに限定されない。「エフェクター分子の効果を改善すること」はまた、効果の欠如のために使用できなかった（例えば、エフェクター分子であると知られなかった）エフェクター分子が、本発明と組み合わせて使用されるときに効果的になることを意味し得る。本発明によって提供されるとおりの有益であるか又は望ましく、1つのコンジュゲートにおけるエフェクター部分及びサポニンの組み合わせに起因し得る任意の他の効果は、「改善された効果」であるとみなされる。本発明の文脈において、本発明のサポニンは、本発明のコンジュゲートにおけるエフェクター分子の機能的有効性の「エンハンサー」である。

20

【0068】

本発明に至るまでの例えば、サポニンなどのグリコシドによる標的化毒素の強化の1つの主要な欠陥は、標的化毒素が受容体媒介性エンドサイトーシス（コンジュゲートの受容体への結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）によって内部移行される一方で、グリコシドが細胞膜を通して受動的に拡散し、おそらくコレステロールとの相互作用を介してエンドソーム膜に到達することである。原則的に、グリコシドは、任意の細胞、非標的細胞（オフターゲット細胞）にも入ることができ、標的化毒素の効果的な放出について標的細胞における非効率的なエンハンサーの利用能及び場合によっては非標的細胞における副作用を引き起こす。1つの主要な問題は、標的化毒素及びグリコシドの移行が異なる動態で進むこと及びこれらの動態が細胞（株）毎及び組織毎に異なり、その結果、2つの物質（ADC、遊離サポニン）の適用のための正確な時間差が、腫瘍（細胞（株））毎に広く変動する可能性があることである。さらに、生物において、これらの物質の遊離、吸収、分布、代謝及び排出もまた異なる。さらに、標的化されない細胞によるグリコシドの非特異的取り込みは、これらの細胞において望まれない効果を誘導し得る。これは、例えば、リソソームに送達されるべきであった化合物の細胞質ゾルへの送達、抗原提示の妨害などであり得る。グリコシド及び標的化薬物の非標的化投与はまた、薬物開発において問題になる可能性があり、関連する当局（例えば、FDA又はEMA）による販売承認を妨げる可能性があるか又は少なくとも延期する可能性がある。本発明に関連して標的化毒素又は標的化薬物は、毒素又は薬物が、標的細胞上の膜結合分子に特異的に標的化されるもの、例えば、膜受容体のリガンドに結合されるか又は標的細胞の細胞膜上の構造を特異的に認識する抗体に結合される毒素又は薬物を意味する。

30

40

【0069】

したがって、エフェクター分子と同じ経路を介して、例えば、エンハンサーが標的細胞のエンドサイトーシス経路の酸性区画内部の有効濃度で利用可能になるために及び毒素と

50

相乗的な作用を呈するために標的細胞にリガンドを標的化することを介して、グリコシドを方向付けることが非常に有用である。したがって、本発明は、リガンド（結合分子）を標的細胞のエンドサイトーシス経路の酸性区画に標的化することを介してエフェクター分子及びエンドソーム脱出エンハンサー（すなわち、本発明のサポニン）の両方を再指示する新規のアプローチを提供する。

【0070】

本発明者らは、s d A bを含むコンジュゲートの一部であるエフェクター分子が、細胞内部のエフェクター分子の効果が考慮されるとき、コンジュゲートによっても含まれるサポニンの影響下で高い効率を有して細胞内部に送達されることを確立した。驚くべきことに、V_{HH}などの相対的に小さいサイズのs d A bにもかかわらず、そのようなs d A bを含むコンジュゲートの細胞表面受容体への結合はやはり、エフェクター分子及びサポニンの両方がV_{HH}などのs d A bを含むコンジュゲートによって含まれるときに生じる。V_{HH}などのs d A bへのサポニンの結合及びエフェクター分子の結合を合わせても、例えば、細胞表面分子に結合するV_{HH}の能力が考慮されるときに立体障害を引き起こさない。すなわち、例えば、腫瘍細胞を最適以下の用量の例えば、A D Cと接触させることは、前記A D Cに共有結合的にカップリングされたサポニンの非存在下で細胞内エフェクター分子活性をもたらさない（標的細胞は、エフェクター分子の生物活性に触れるときに効率的に殺されない）。しかしながら、標的腫瘍細胞が、エフェクター分子を含み、サポニンを含み、及び標的細胞結合s d A bをさらに含む本発明のコンジュゲートと接触されるとき、効率的な腫瘍細胞の死滅が達成される。

【0071】

本発明のコンジュゲートで単一の細胞表面分子を標的化することによって、本発明のコンジュゲートにおけるs d A bなどの細胞表面分子標的化抗体に結合されるサポニン及びエフェクター部分の、細胞表面上の細胞表面分子を露出している標的化される細胞の細胞質ゾル及びその内部への送達は、例えば、本発明のサポニンを欠く、したがって、細胞標的化サポニン（本発明のコンジュゲート）の存在を伴わない通常のA D Cのみと細胞を接触させることと比較して改善され、より特異的になる。コンジュゲートの細胞表面分子標的化s d A bによる標的化のために選択された異常細胞は、理想的には、細胞表面分子標的化分子が結合することができる細胞表面分子上のエピトープを高度に有し（すなわち、例えば、腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの標的化される細胞上の標的化される細胞表面分子の発現が、例えば、健常細胞などの標的化されない細胞上の発現よりも相対的に高い）、及び／又は特に患者内の（隣接している）健常細胞が考慮されるとき、コンジュゲートの細胞表面分子標的化s d A bの結合に対して標的化される細胞表面分子中のエピトープを露出させる。好ましくは、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化s d A bによって標的化される細胞表面分子は、健常細胞と比較して、標的化（疾患、腫瘍）細胞上で相対的に高く及び／又は特異的に発現される。ある実施形態は、本発明のコンジュゲートであり、腫瘍細胞受容体などのコンジュゲートの細胞表面分子標的化s d A bのための標的細胞表面分子は、健常（隣接している）細胞の表面上の細胞表面分子の発現と比較して特異的に発現されるか又は相対的に高い程度で発現される。したがって、標的化される細胞表面分子上のエピトープは、理想的には、標的化疾患細胞に固有であり、及び標的化される細胞の表面に少なくとも特異的に存在し、露出される。標的化される細胞上の細胞表面分子上のエピトープに対する本発明のコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート及び細胞表面分子の複合体のエンドサイトーシスが続く（受容体に対するコンジュゲートの結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く）。コンジュゲートは、標的化されるべきではない健常細胞と比較して標的化される細胞上で十分な程度で特異的に発現されるか又は固有に発現される細胞表面分子との結合相互作用を介してのみ標的細胞に入ることができるため、コンジュゲートによって含まれるエフェクター部分及びサポニンの治療的に有効な量の標的細胞内部での蓄積は、標的化される細胞表面分子の発現レベルが、ある特定の最小発現閾値を超える場合にのみ可能であり、発生する。同時に、コンジュゲートの細胞表面分子標的化s d A bに結合されるエフェクター部分が、共有結合さ

れたサポニンを有する全く同じコンジュゲートの存在下でのみその細胞内（例えば、細胞傷害性又は遺伝子サイレンシング）活性を発揮することが可能であるという事実はまた、共有結合されたサポニンを有しないADCへの細胞の暴露と比較して、例えば、エフェクター部分によって標的化され、影響されることにならない健常細胞及び健常組織に対するエフェクター部分の負の望まれない副作用に対する保護を提供する。すなわち、コンジュゲートが結合する可能性のある露出された細胞表面分子の十分に低い発現或いは欠如により、理想的には、コンジュゲートによって含まれるサポニンの影響下でエフェクター部分のエンドソーム脱出をもたらすことになる量までコンジュゲートを（非標的化）健常細胞に進入させない。本発明によるカップリングされたサポニンを有するADC又は共有結合的にカップリングされたサポニンを有するAOCは、カップリングされたサポニンを有しないADC又はAOCが治療レジメンにおいて適用されたときと比較して低用量で 사용할ことができるため、健常細胞における低い程度でのカップリングされたサポニンを有するADCの進入又はカップリングされたサポニンを有するAOCの進入は既に、例えば、腫瘍細胞及び自己免疫細胞などの標的疾患細胞の標的化及び死滅が考慮されるときに望まれない副作用の発生に関してより低いリスクを有する。

【0072】

したがって、コンジュゲートにおけるsdAbの包含は、IgGなどの抗体、又はその結合断片若しくは結合ドメインの包含と比較して多数の利点を有する。重要なこととして、sdAbはIgG中に存在するFcテイルを含まないため、コンジュゲートが投与される宿主の内皮細胞などの細胞上のFc受容体に対するコンジュゲートの結合に起因するオフターゲット副作用に関するリスクは存在しない。したがって、本発明のコンジュゲートのリスクプロファイルは、IgGに基づくADC及びAOCと比較して、又はFcテイルを含むADC若しくはAOCと比較して改善される。加えて、本発明のコンジュゲートはFc受容体によって結合できないため、コンジュゲートは既に、目的の標的細胞表面分子とは異なる細胞表面受容体によるコンジュゲートの望まれない捕捉が少ないこと又はないことに起因して、完全長抗体に基づくADC及びAOCにより同じエフェクター分子活性に達するために必要とされる用量より少ない用量で効果的である。さらに、例えば、Fab、scFv、IgGと比較してsdAbの相対的に小さいサイズに起因して、組織移行が改善され、コンジュゲートが療法を必要とする患者に投与されると、標的細胞に達するのに有利である。本発明のコンジュゲートにおけるsdAbの適用の全てのこれらの利点は、Fcテイルを含むIgGなどのより大きい抗体又はその断片の適用と比較したとき、ADC又はAOCと同様に、本発明のコンジュゲートによって含まれるときにエフェクター分子に関する治療域の改善をもたらす。例えば、sdAbに基づくADCは、エフェクター分子が例えば毒素であるときに、標的化される腫瘍細胞の場合において標的細胞の死滅の改善を達成する可能性があり、同じ用量で、IgGに基づき及び同じエフェクター分子を含むADCは、有効ではないか又は最適以下で有効であるにすぎない。本発明の態様のために、ここで、同じエフェクター分子を含む抗体に基づくADC又はAOCが使用される場合に必要より高い用量と比較して、sdAbを含むコンジュゲート、すなわち、本発明のコンジュゲートの一部としてより低用量のエフェクター分子で患者を治療し、それとともに標的細胞において同じ又は改善されたエフェクター分子媒介性効果に到達することが可能になる。より低い用量での本発明のそのようなコンジュゲートの投与は、例えば、非標的化、健常細胞への非特異的な進入によって、副作用の発生に関して患者のリスクを低下させる。これは、例えば、コンジュゲートによって含まれるsdAbによって標的化される細胞表面分子が、標的（腫瘍）細胞上でより高度に発現されるが、そのような標的細胞上で固有に発現されないときに重要である。より低い用量のコンジュゲートは、非腫瘍健常細胞などのそのように低い発現体へのコンジュゲートの結合に関するリスクを低下させる。

【0073】

本発明者らはまた、本発明のコンジュゲートの治療域が、本発明のコンジュゲートにおける共有結合されたサポニンの組み込みに起因して広げられることを見出さした。すなわ

ち、サポニンとともに提供されるADC又はAOC（すなわち、本発明のコンジュゲート）が、標的細胞の表面でのその結合パートナーへのsdAbの結合時に標的細胞と接触されるとき、本発明のコンジュゲートによって含まれるサポニンもまた、コンジュゲートのエフェクター分子とともに近接して、すなわち、標的細胞の表面に運ばれる。細胞表面分子を有する標的細胞、すなわち、コンジュゲートによって含まれるsdAbのための標的が、本発明のコンジュゲートと接触されるとき、エフェクター分子の有効量及びサポニンの有効量の両方は、標的細胞がサポニンの非存在下又は遊離（非標的化）サポニンの存在下でADC又はAOCと接触されるときより低い。本発明のコンジュゲートの一部としての標的化サポニンの存在は、標的細胞中のエフェクター分子の活性を増強し、その結果、コンジュゲートの治療域、及びそれとともにエフェクター分子の治療域が広げられる。十分なエフェクター分子の効率は、標的細胞が本発明のコンジュゲートと接触されるときにより低い用量で達成される。同様の効果は、サポニンのエフェクター分子増強活性が考慮されるとき、ADC又はAOCがサポニン又はその機能性誘導体の存在下で標的細胞と接触されるときであるが、標的（腫瘍）m細胞へのコンジュゲートの標的化された結合のためのsdAbとともに本明細書でエフェクター分子及びエフェクター分子活性強化サポニンの両方を含む本発明のコンジュゲートが適用されるときに確立された有効用量と比較して100倍～1000倍高い遊離サポニン（誘導体）の濃度で本発明者らによって見出される。したがって、サポニン又はその誘導体に結合分子（すなわち、本発明のコンジュゲートによって含まれるsdAb）を提供すること及びまた全く同じコンジュゲートにエフェクター分子（すなわち、本発明のコンジュゲートにより含まれるエフェクター分子）を提供することは、本発明のコンジュゲートが、その表面上の細胞表面分子、すなわち、sdAbのための結合標的を発現する標的細胞と接触されるとき、エフェクター分子活性増強効果の改善をもたらす。標的化サポニンは既に、標的細胞内へのエフェクター分子の送達、及びエンドソーム又はリソソームから細胞質ゾルへの前記細胞の送達における遊離サポニンより低い用量で効果的であり、エフェクター分子は、その標的結合パートナーに結合するべきであり、その生物活性（例えば、標的細胞が腫瘍細胞である場合及びエフェクター分子が、例えば毒素である場合の細胞死滅）を発揮するべきであるが、本発明者らは、単一の分子におけるサポニン、標的化部分（sdAb）及びエフェクター分子（例えば、毒素、AON）の組み合わせは、さらにより効果的であることを見出した。

【0074】

したがって、本発明者らは、サポニン（誘導体）、エフェクター分子及び標的細胞でのコンジュゲートの標的化された送達のためのsdAbを含むコンジュゲートを含む医薬組成物を提供し、医薬組成物は、共有結合的に連結されたサポニンとともに提供されない完全長抗体又はそのコンストラクトを含むFcに基づく既存のADCと比較したとき、改善された治療域、コンジュゲートによって含まれる有効用量のエフェクター分子がエフェクター分子に基づく療法を必要とする患者に投与されるときに副作用を誘導するリスクの低減、及び本発明のコンジュゲートの一部としての標的化サポニンの影響下での標的細胞内部への、より具体的には、そのような標的細胞の細胞質ゾル内部へのコンジュゲートの送達の改善に起因する改善されたエフェクター分子活性を有する。本発明のそのようなコンジュゲートが、ある用量の遊離サポニン（誘導体）とともにエフェクター分子に基づく療法を必要とする患者に投与されることは本発明の一部であるが、コンジュゲート単独での適用が好ましい。

【0075】

ある実施形態は、抗体、好ましくは、免疫グロブリンG起源、好ましくは、ヒト起源の重鎖に由来するV_Hドメイン；抗体、好ましくは、免疫グロブリンG起源、好ましくは、ヒト起源の軽鎖に由来するV_Lドメイン；ラクダ科（Camelidae）起源又は可変重鎖の新規の抗原受容体（V_{NAR}）ドメインなどのIg-NAR起源などの重鎖のみの抗体（HCAb）に由来するものなどのV_{HH}ドメイン（好ましくは、HCAbは、ラクダ科（Camelidae）起源に由来する）のいずれか1つ以上である少なくとも1つのsdAbを含み；好ましくは、少なくとも1つのsdAbが、ラクダ、ラマ、アルパカ、

ヒトコブラクダ、ビクーナ、グアナコ及びフタコブラクダからのH C A bに由来するものなどのラクダ科(C a m e l i d a e)起源(ラクダ類V_H)のH C A bに由来するV_HHドメインである本発明のコンジュゲートである。

【0076】

特に、V_HHドメインは、本発明のコンジュゲートにおける適用に好適である。そのようなV_HHドメインは、それらの高い安定性、すなわち、アンフォールディングに対する耐性、例えばI g Gに存在し、I g Gが2つのVドメインを介してその結合パートナーに結合するのに必要な第2のVドメインの存在を必要とせずに結合パートナーに結合するそれらの能力、当技術分野で知られる技術(ラクダ類動物の免疫化、ファージディスプレイ技術など)によるそれらの生産の容易さ、標的(腫瘍)細胞がそのような(器官)組織の内部又は一部として位置する場合に有益である完全長I g Gに見られるよりも高い程度に組織に浸透するそれらの能力のために一般に有名である。

10

【0077】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子の1つ及び／若しくは少なくとも1つのサポニンの1つに共有結合された単一の第1のs d A b、又は少なくとも1つのs d A bが少なくとも1つのエフェクター分子に結合され及び／又は少なくとも1つのs d A bが少なくとも1つのサポニンに結合される2つ以上のs d A b、又は少なくとも1つのエフェクター分子のエフェクター分子若しくは少なくとも1つのサポニンのサポニン、又は両方にそれぞれ別々に結合される少なくとも2つのs d A bの全てとともに少なくとも2つのs d A bを含む本発明のコンジュゲートである。

20

【0078】

ある実施形態は、少なくとも1つのs d A bが、少なくとも2つのs d A bを含み、これらは同じs d A bであり、好ましくは、2～8つのs d A b、より好ましくは、2～4つのs d A bである本発明のコンジュゲートである。

【0079】

ある実施形態は、細胞表面分子上の同じ結合部位に結合することができる1～8つのs d A bを含み、少なくとも1つのエフェクター分子及び／又は少なくとも1つのサポニンが、1～8つのs d A bのうちの単一の第1のs d A bに結合されるか又は少なくとも1つのエフェクター分子及び／又は少なくとも1つのサポニンが、存在する場合、s d A bの2つ以上に結合され、少なくとも1つのエフェクター分子及び少なくとも1つのサポニンが、同じs d A bに結合されるか又は異なるs d A bに結合され、好ましくは、少なくとも1つのエフェクター分子の各々が、別々のs d A bに結合され及び／又は少なくとも1つのサポニンの各々が、別々のs d A bに結合され、エフェクター分子及びサポニンが、同じs d A bに結合されるか又は別々のs d A bに結合される本発明のコンジュゲートである。

30

【0080】

互いに共有結合的に連結される複数のs d A bの(直鎖状の)連なりを含む本発明のコンジュゲートを提供することによって、より高いアビディティーで標的細胞に結合するコンジュゲートの能力の利点を提供することができ、標的細胞によるコンジュゲートの取り込み(エンドサイトーシス)の改善をもたらすことができる(コンジュゲートの受容体への結合の後に、コンジュゲート／受容体複合体の内部移行が続く)。

40

【0081】

同期化は、エフェクター分子に対するサポニンのエンドソーム脱出強化効果の適用が考慮されるとき、マウスに関して成功した送達戦略とヒトへのその適用の間にあるミッシングリンクである。実際に、本発明者らは、一連のインビボマウス腫瘍モデルにおいて、ある用量の遊離サポニン及びある用量の例えばカップリングされたサポニンを有しないA D Cをマウスに別々に投与することが、遊離サポニンの存在下にてA D Cで治療されない対照動物と比較して腫瘍増殖の遅延、腫瘍退縮、腫瘍増殖の減少及び緩徐化などのいずれかの所望の抗腫瘍活性をもたらさなかったことを確立した。また、本明細書の下の実施例4～18を参照されたい。遊離サポニンは、様々な投与経路及びA D Cを投与する瞬間と比

50

較して遊離サポニンを投与する様々な時点（ADCの投与前、投与中及び投与後に遊離サポニンを投与する）を使用して投与された。インビボ腫瘍モデルにおいて試験されるADCは、セツキシマブー吉安チン（遊離SO1861を伴う）、又はトラスツズマブーサポリン（遊離SO1861を伴う）であった。遊離サポニンの用量を変化させることは、効果的な抗腫瘍活性をもたらさなかった。参照されるADCは、それ自体が担腫瘍動物に対するいずれかの有利な抗腫瘍効果を与えなかった用量で投与された。驚くべきことに、本発明者らはここで、ヒト腫瘍細胞を使用する様々なインビトロでの哺乳動物細胞に基づくアッセイ及び／又は様々なインビボ動物腫瘍モデルにおける有利な抗腫瘍活性が、本発明によるコンジュゲートで細胞又は動物を治療することによって達成され得ることを確立した。コンジュゲートは任意選択により本発明による足場を含む（下記を参照のこと；それに共有結合される1つ又は複数のサポニン部分を有するオリゴマー又はポリマー構造を含む共有結合性サポニンコンジュゲート）。足場は、例えば、切断可能又は切断不可能な結合を介する共有結合されたサポニン（例えば、SO1861、QS-21）及び／又は切断不可能な結合又は切断可能な結合を介する共有結合されたエフェクター部分（例えば、吉安チン、遺伝子サイレンシングアンチセンスBNA（HSP27））を有する三官能性リンカーであり、足場は、セツキシマブ、トラスツズマブ、OKT-9などのモノクローナル抗体などのコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に対して共有結合で連結されるか、又は足場は、デンドロン、例えば、G4-デンドロン（例えば、4つのサポニン分子などの4つの部分が結合することができる）などのデンドロン、又は例えば、2つのサポニン及び2つのエフェクター分子を結合するためのデンドロンであって、コンジュゲートのsdAbなどの細胞表面分子標的化抗体に（共有結合的に）カップリングするための化学基を含むデンドロンである。例えば、タンパク質性毒素によって発揮される細胞毒性が考慮されるとき又は腫瘍細胞における遺伝子サイレンシングが考慮されるとき、インビボ及び／又はインビトロ抗腫瘍細胞活性を示す、本発明によるこれらの足場のいくつかを例示する、さらなる実施形態及び実施例の節に対する参照がなされる。

【0082】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、遊離サポニンと合わせたADCによる担腫動物の治療が考慮されるときに観察される失敗を鑑みて、標的細胞、例えば、腫瘍細胞又は自己免疫細胞のエンドサイトーシス経路の区画又は小胞における、少なくとも1つのサポニン、及びエフェクター部分、好ましくは毒素又はオリゴヌクレオチドの両方の存在を同期させることが好ましい。ADC及び遊離サポニンでは、インビボで相乗効果を得るために、後期エンドソームでの分子の存在を同期させることは、本発明者らの試みに従って有利には得られなかった。一態様では、本発明は、好ましくは、単一のコンジュゲート分子においてエフェクター部分及びサポニンを組み合わせることに關して少なくとも以下の問題を解決する：いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、例えば、（共有結合性の）特に、単一の切断可能である保持可能なカップリングのために使用され得るサポニン内の唯一の適切な化学基が、エンドソーム脱出活性のために必要となる。例えば、本明細書に例示される本発明のサポニンの著しいエンドソーム脱出エンハンサー効果は10年を超えて知られているが、免疫増強アジュバント物質の使用が暗示されたワクチン接種管理体制におけるサポニンの適用以外に臨床試験においてサポニンが薬学的に活性な物質と組み合わせて使用されてこなかったのは、既知の制約のためである可能性が最も高い。例えば、共有結合されたサポニンとともに本発明のコンジュゲートを提供することは、例えば、いくつかのサポニンを有する足場の文脈において、少なくとも部分的にはこれらの困難を解決する。驚くべきことに、アジュバント構成成分としてサポニンを含むワクチン接種の文脈においてそれらの免疫増強活性のために以前に適用されたサポニンは、インビトロ又はインビボでの抗腫瘍活性のための本発明のコンジュゲートによって含まれるsdAbなどの細胞表面分子標的化抗体に（共有結合的に）カップリングするのに現在においても好適である。

【0083】

ある実施形態は、少なくとも1つのsdAbが単一のsdAbであるか若しくは少なく

10

20

30

40

50

とも2つ、好ましくは2つのsdAbであり、sdAbが、HIVgp41などの細胞の細胞表面分子に結合することができるか、又はsdAbが、細胞の腫瘍細胞表面受容体などの細胞の細胞表面受容体、好ましくは、腫瘍細胞特異的受容体、より好ましくは、CD71、CA125、EpCAM(17-1A)、CD52、CEA、CD44v6、FAP、EGF-IR、インテグリン、シンデカン-1、血管性インテグリンアルファVベータ-3、HER2、EGFR、CD20、CD22、葉酸受容体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L受容体、前立腺特異的膜抗原(PSPA)、CanAg、インテグリンアルファV、CA6、CD33、メソセリン、Cripto、CD3、CD30、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、エフリンA4、MUC-1、Trop2、CEACAM5、CEACAM6、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD38、FGFR3、CD7、PD-L1、CTLA-4、CD52、PDGFRA、VEGFR1、VEGFR2、c-Met(HGFR)、EGFR1、RANKL、ADAMTS5、CD16、CXCR7(ACKR3)、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)のいずれか1つ以上から選択される、最も好ましくはHER2、c-Met、VEGFR2、CXCR7、CD71、及びEGFR1から選択される受容体に結合することができる本発明のコンジュゲートである。

【0084】

本発明のコンジュゲートによって含まれるsdAbが、標的細胞上に特異的に発現される細胞表面分子のための結合特異性を有することは、本発明の一部である。「特異的に発現される」は、標的細胞上のみの細胞表面分子の固有の発現として本明細書で理解されるべきであるか(例えば、コンジュゲートに結合するべきではない健常細胞は、標的化される分子の細胞表面の露出の欠如に起因して標的化されない)、又は例えば、コンジュゲートに結合するべきではないか又は少なくともはるかに低い程度で結合するべき健常細胞上の細胞表面分子の低い発現と比較して標的細胞上の標的細胞表面分子の上方制御されたか又は相対的に高い発現として本明細書で理解されるべきである。これらの列挙される細胞受容体は、コンジュゲートの標的である細胞に十分に特異的であり、それとともにコンジュゲートによる結合のための好ましい候補であるそのような細胞表面分子である。標的細胞上の細胞表面分子の発現が本発明のコンジュゲートによって標的化されることにならない他の細胞上の発現と比較されるときにある特定の細胞表面分子の特異性が高いほど、細胞内部のエフェクター分子の活性が考慮されるときに治療域が良好になることが理解されることになる。例えば、コンジュゲートによる標的化のための好適な標的は、他の腫瘍細胞特異的受容体、HER2、EGFR、例えば、EGFR1、及びCD71の中にある。

【0085】

ある実施形態は、少なくとも1つのsdAbが、単一のsdAbであるか又は少なくとも2つ、好ましくは、2つであり、sdAbが、抗CD71 sdAb、抗HER2 sdAb、抗CD20 sdAb、抗CA125 sdAb、抗EpCAM(17-1A) sdAb、抗EGFR sdAb、抗CD30 sdAb、抗CD33 sdAb、抗血管性インテグリンアルファvベータ-3 sdAb、抗CD52 sdAb、抗CD22 sdAb、抗CEA sdAb、抗CD44v6 sdAb、抗FAP sdAb、抗CD19 sdAb、抗CanAg sdAb、抗CD56 sdAb、抗CD38 sdAb、抗CA6 sdAb、抗IGF-1R sdAb、抗インテグリンsdAb、抗シンデカン-1 sdAb、抗CD79b、抗c-Met sdAb、抗EGFR1 sdAb、抗VEGFR2 sdAb、抗CXCR7 sdAb、抗HIVgp41から選択され、sdAbが、好ましくは、V_{HH}、より好ましくは、ラクダ類V_Hである本発明のコンジュゲートである。

【0086】

ある実施形態は、少なくとも1つのsdAbが、HER2、CD71、HIVgp41及び／又はEGFRに結合することができるsdAbを含み、前記sdAbが、好ましくは、V_{HH}、より好ましくは、ラクダ類V_Hである本発明のコンジュゲートである。

【0087】

ある実施形態は、少なくとも1つのs d A bが、クローン11 A 4、クローン18 C 3、クローン22 G 1 2、クローンQ 1 7若しくはクローンQ 1 7－C－タグによって生成されるs d A bから選択されるH E R 2に結合するためのs d A bを含むか；又はE G F Rに結合するための及びクローン抗E G F R Q 8 6－C－タグによって生成されるs d A bを含むか；又はC D 7 1に結合するための及びクローン抗C D 7 1 Q 5 2－C－タグによって生成されるs d A bを含むか；又はH I V g p 4 1に結合するための及びクローン抗H I V g p 4 1 Q 8－Cタグによって生成されるs d A bを含むか；又は配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29及び31のいずれか1つのc D N Aによってコードされるs d A bを含むか；又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36～72のアミノ酸配列を有するs d A bのいずれか1つを含み、任意選択により、コンジュゲートがさらに、少なくとも1つのs d A bとは異なるさらなるs d A bであって、配列番号33、34及び35のアミノ酸配列を有するさらなるs d A bのいずれか1つ以上などのアルブミンに結合するためのさらなるs d A bを含み、好ましくは、さらなるs d A bが、V_HH、より好ましくは、ラクダ類V_Hである本発明のコンジュゲートである。

10

【0088】

本発明のコンジュゲートにおける組み込みに好適なV_HHは、例えば、単ドメイン抗体データベース(Wilton, E. E. et al. (2018))、特許出願の米国特許出願公開第20160251440号明細書(抗CD123、抗CEACAM)、米国特許第9683045号明細書(抗c-Met)、米国特許出願公開第20090252681号明細書(抗EGFR、抗IGF-1R)、米国特許第9969805号明細書(抗HER2)、米国特許出願公開第20190023796A1号明細書(抗HER3)、及び抗HER2に関してKijanka et al. (2013)、及び抗HER2に関してMercier et al. (2019)において見出される。一連の好適なV_HHのアミノ酸配列及び／又はc D N A配列もまた、腫瘍細胞特異的受容体に結合するそれらの能力に鑑みて、配列番号1～32及び36～72としての抗HER2、抗HER3、抗CD123、抗CEACAM、抗c-Met、抗EGFR、抗IGF-1R、抗PD-L1、抗CTLA-4、抗CD19、抗HER1及び抗VGFR2に関して本明細書の下で提供される。特に、腫瘍細胞特異的な受容体HER2、VEGFR及びCD71のいずれかの結合部位に結合することができるV_HHは、本発明のコンジュゲートにおける組み込みに好適である。本発明者らは、そのような受容体のいずれか1つを標的化するV_HHを含むADCが、s d A bに結合されるエフェクター分子の送達において効果的であることを明らかにした。例えば、実施例の節、及び図4～7を参照されたい。

20

30

【0089】

ある実施形態は、エフェクター分子が、薬物分子などの小分子、タンパク質毒素などの毒素、BNAなどのオリゴヌクレオチド、異物性核酸又はs i R N A、酵素、ペプチド、タンパク質、又はその任意の組み合わせの少なくとも1つを含むか又はそれらからなる。

【0090】

ある実施形態は、エフェクター分子が、タンパク質性毒素などの毒素、薬物、ポリペプチド又はポリヌクレオチドなどの薬学的に活性な物質である本発明によるコンジュゲートである。本発明における薬学的に活性な物質は、生物、好ましくは、脊椎動物、より好ましくは、ヒトにおいて有益なアウトカムを達成するために使用されるエフェクター分子である。利点は、疾患及び／又は症状の診断、予後、治療、治癒及び予防を含む。薬学的に活性な物質はまた、望まれない有害な副作用を引き起こす可能性がある。この場合、薬学的に活性な物質が特定の症例に好適であるかどうかを判断するために、長所及び短所が比較されなければならない。細胞内部にある薬学的に活性な物質の効果が、生物体全体、例えば、ヒト患者にとって支配的に有益である場合、細胞は標的細胞と呼ばれる。細胞内部での効果が、生物体全体にとって支配的に有害である場合、細胞はオフターゲット細胞と

40

50

呼ばれる。細胞培養物及びバイオリアクターなどの人工系において、標的細胞及びオフターゲット細胞は、目的に依存し、使用者によって定義される。エフェクター分子の例は、非天然アミノ酸又は核酸を含むポリペプチド及びポリヌクレオチドを含む薬物、毒素、ポリペプチド（酵素など）、及びポリヌクレオチドである。エフェクター分子としては、とりわけ、DNA：一本鎖DNA（例えば、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのためのDNA）；直鎖状二本鎖DNA；環状二本鎖DNA（例えば、プラスミド）；RNA：-mRNA（例えば、TLAエフェクター分子ヌクレアーゼ）、tRNA、rRNA、siRNA、miRNA、asRNA、LNA及びBNA；タンパク質及びペプチド：Cas9；毒素（例えば、サポリン、ジアンチン、ゲロニン、（デ）ボーガニン、アグロスチン、リシン（毒素A鎖）；ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アポプチン、ジフテリア毒素、シュードモナス（*pseudomonas*）外毒素）代謝酵素（アルギニノコハク酸リアーゼ、アルギニノコハク酸合成酵素）、凝固カスケードの酵素、修復酵素；細胞シグナル伝達のための酵素；細胞周期調節因子；遺伝子調節因子（NF- κ Bなどの転写因子又はメチオニンリプレッサーなどの遺伝子リプレッサー）が挙げられる。本発明において使用されるとおりの毒素は、細胞を死滅させるか又は不活性化させることができる薬学的に活性な物質として定義される。好ましくは、標的化毒素は、標的細胞にとってのみ、又は少なくとも支配的に毒性であるがオフターゲット細胞には毒性ではない毒素である。標的化毒素の正味の効果は、好ましくは、生物体全体に有益である。

【0091】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子が、ベクター、遺伝子、細胞自殺誘導導入遺伝子、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO、AON）、短い干渉RNA（siRNA）、抗マイクロRNA（抗miRNA）、DNAアプタマー、RNAアプタマー、mRNA、小環状DNA、ペプチド核酸（PNA）、ホスホラミダイトモルホリノオリゴマー（PMO）、ロックド核酸（LNA）、架橋核酸（BNA）、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸（FANA）、2'-O-メトキシエチル-RNA（MOE）、3'-フルオロヘキシトール核酸（FHNA）、プラスミド、グリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）、又はその誘導体、より好ましくは、BNA、例えば、HSP27タンパク質発現をサイレンシングするためのBNA又はアポリポタンパク質B発現をサイレンシングするためのBNAのいずれか1つ以上から選択される本発明のコンジュゲートである。

【0092】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子が、短い干渉RNA（siRNA）、短いヘアピンRNA（shRNA）、抗ヘアピン型マイクロRNA（miRNA）、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA（dsRNA）、抗マイクロRNA（抗miRNA、抗miR）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、mRNA、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸（LNA）、架橋核酸（BNA）、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋核酸（BNA^{NC}）、BNAに基づくsiRNA、及びBNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド（BNA-AON）のいずれか1つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである本発明のコンジュゲートである。

【0093】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子が、抗miRNA、BNAに基づくsiRNAなどのBNA-AON又はsiRNAのいずれか1つから選択される、好ましくは、化学修飾されたsiRNA、代謝的に安定なsiRNA、及び化学修飾され代謝的に安定なsiRNAから選択されるオリゴヌクレオチドである本発明のコンジュゲートである。

【0094】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子が、遺伝子を、そのような遺伝子を含む細胞中に存在するときにサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、遺伝子が、遺伝子：アポリポタンパク質B（apoB）、トランスサイレチン（TTT）、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型（PCSK9）、デルターア

ミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロニン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体成分C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファ-1アンチトリプシン (AAT) 及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) のいずれか1つであり、並びに／又は異常なmiRNAを、そのような異常なmiRNAを含む細胞中に存在するときに標的化することができる本発明のコンジュゲートである。

【0095】

ある実施形態は、エフェクター分子が、mRNAを、そのようなmRNAを含む細胞中に存在するときに標的化することができるオリゴヌクレオチドであり、mRNAが、タンパク質：apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT及びLDHのいずれか1つの発現に関与するか、又は発癌性miRNA (onco-miR) の阻害又はonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を、そのようなmiRNAを含む細胞中に存在するときに弱めるか又は回復させることができる本発明のコンジュゲートである。

【0096】

本発明者らは、腫瘍細胞と接触される、BNA (HSP27) などの共有結合的にカップリングされたアンチセンスBNA及び本発明の共有結合的にカップリングされたサポニン (BNA及びサポニンの両方が切断可能な結合を介して抗体 (例えば、セツキシマブ) にカップリングされる) とともに提供される腫瘍細胞標的化モノクローナル抗体が、対照と比較して及びBNAのみを有し、サポニン (SO1861、Quil-A) を有しないAOCと比較して、腫瘍においてインビボでHSP27をサイレンシングすることができることを示す。したがって、本発明のADC-サポニンコンジュゲート又は本発明の抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート-サポニンコンジュゲート (AOC-サポニン)、例えば、抗体-BNA-サポニンコンジュゲートを投与することによって、ADC-サポニン又はAOC-サポニンに、同じ用量でモノクローナル抗体に共有結合的に結合されたサポニンを有しないADCのみ又はAOCのみでは見られない抗腫瘍細胞活性を与える。注目すべきことに、2つの別々のコンジュゲートの組み合わせとしてのAOC及び共有結合的にカップリングされたサポニンを有する別々のモノクローナル抗体は、マウスの別々の群において別々に担腫瘍マウスに投与されるとき、対照群 (溶媒のみが投与される) と比較して腫瘍細胞のHSP27発現を増加させる。本発明のエフェクター部分を含む本発明のAOC-サポニンコンジュゲートの投与のみが、対照と比較したときにHSP27発現の減少を示す。アンチセンスBNA (HSP27) は、Zhang et al. (2011) [Y Zhang, Z Qu, S Kim, V Shi, B Liao1, P Kraft, R Bandaru, Y Wu, LM Greenberger and ID Horak, Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection, Gene Therapy (2011) 18, 326-333] に従うオリゴ核酸配列を有するBNAであった。注目すべきことに、本発明者らの知る限り、BNAは、遊離核酸としての適用のために設計される。本発明者らは、現在、アンチセンスBNAが、リガンド又は抗体と (非) 切断可能なリンカーを介して、遺伝子サイレンシング活性がインビトロで、より重要なことにインビボで担腫瘍動物の腫瘍細胞で保持されるように共有結合的にカップリングされ得ることを初めて実証している。BNAに基づくAOCを提供するこのアプローチは、必要とするヒト (癌) 患者に標的化BNAを投与する新規の方法を切り開いている。

【0097】

ある実施形態は、少なくとも1つのエフェクター分子が、好ましくは、ペプチド、タンパク質、酵素及びタンパク質毒素のいずれか1つ以上から選択される少なくとも1つのタンパク質性分子を含むか又はそれからなる本発明のコンジュゲートである。本発明者らは、非常に効果的な腫瘍細胞の死滅は、HER2、VEGFR、CD71のいずれかに結合

10

20

30

40

50

する s d A b が選択され、s d A b が、ジアンチン又はサポリンなどのタンパク質毒素などの毒素と組み合わせ合わせられ、及び s d A b が、サポニンと組み合わせられるときに達成されることを見出した。s d A b 及びエフェクター分子を含むある特定のコンジュゲートの高い有効性を実証する例は、実施例の節において提供され、図 4 ～ 7 において示される。

【0098】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのエフェクター分子が、ウレアーゼ及び C r e ーリコンビナーゼ、タンパク質性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、タンパク質毒素、細菌毒素、植物毒素の少なくとも 1 つを含むか又はそれらからなり、より好ましくは、アポブチンなどのウイルス毒素；志賀毒素、志賀毒素様毒素、緑膿菌 (*P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a*) 外毒素 (P E) 又は P E の外毒素 A、全長又は短縮型ジフテリア毒素 (D T)、コレラ毒素などの細菌毒素；アルファーサルシンなどの真菌毒素；リボソーム不活性化タンパク質及びジアンチン、例えば、ジアンチン-30 又はジアンチン-32、サポリン、例えば、サポリン-S3 又はサポリン-S6、ボーガニン又はボーガニンの脱免疫化誘導体デボーガニン、志賀毒素様毒素 A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、リシン、リシン A 鎖、モデクシン、モデクシン A 鎖、アブリン、アブリン A 鎖、ボルケンシン、ボルケンシン A 鎖、ビスクミン、ビスクミン A 鎖などの 2 型リボソーム不活性化タンパク質の A 鎖を含む植物毒素；又はカエル R N a s e などの動物若しくはヒト毒素、又はグランザイム B 若しくはヒトアンジオゲニン、又はその任意の毒性断片若しくは毒性誘導体のいずれか 1 つ以上から選択され；好ましくは、タンパク質毒素は、ジアンチン及び／又はサポリンである本発明のコンジュゲートである。

【0099】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのエフェクター分子が、少なくとも 1 つのペイロードを含むか又はそれらからなる本発明のコンジュゲートである。

【0100】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのエフェクター分子が、リボソームを標的化する毒素、伸長因子を標的化する毒素、チューブリンを標的化する毒素、DNA を標的化する毒素及び RNA を標的化する毒素の少なくとも 1 つ、より好ましくは、エムタンシン、パースドトクス、マイタンシノイド誘導体 D M 1、マイタンシノイド誘導体 D M 4、モノメチルアウリスタチン E (M M A E、ベドチン)、モノメチルアウリスタチン F (M M A F、マホドチン)、カリチアマイシン、N-アセチル-γ-カリチアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (P B D) 二量体、ベンゾジアゼピン、C C-1065 類似体、デュオカルマイシン、ドキシソルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、5-フルオロウラシル (5-F U)、ミトキサントン、ツブリシン、インドリノベンゾジアゼピン、A Z 13599185、クリプトフィシン、リゾキシシン、メトトレキサート、アントラサイクリン、カンプトテシン類似体、S N-38、D X-8951 f、エキサテカンメシル酸塩、緑膿菌 (*P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a*) 外毒素の短縮形態 (P E 38)、デュオカルマイシン誘導体、アマニチン、α-アマニチン、スプライソスタチン、タイランスタチン、オゾガマイシン、テシリシン、アンバースタチン 269 及びソラブタンシン、若しくはその誘導体のいずれか 1 つ以上を含むか又はそれらからなる本発明のコンジュゲートである。

【0101】

本発明において有用なエフェクター部分は、その効果を発揮するために後期エンドソーム脱出に依拠することが好ましい。例えば、シュードモナス属 (*p s e u d o m o n a s*) 外毒素などのいくつかのエフェクター分子は、「後期エンドソーム段階」の前に他のオルガネラに経路を変更し、したがって、通常、本発明によるコンジュゲートにおける組み込みから恩恵を被らないことになる。しかしながら、そのような毒素は、例えば、経路変更に関与するシグナルペプチドを欠失させることによって、本発明による使用のために適応させられ得る。特に、高度に毒性であり及びエンドソームを脱出して細胞を死滅させるのに 1 分子のみを必要とすることになる毒素は、効力が弱くなるように修飾され得る。少

なくとも2個、より好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも20個、より好ましくは少なくとも50個、最も好ましくは少なくとも100個の毒素分子がエンドソームを脱出する（そして細胞質ゾルに入る）場合、細胞を死滅させる毒素を使用することが好ましい。本発明のコンジュゲートは、腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの標的細胞で結合された1つ又は複数のエフェクター部分を含む足場を標的化するための、共有結合された1つ又は複数のエフェクター部分を含む、共有結合的にコンジュゲートされた機能を持たされた足場、すなわち、オリゴマー若しくはポリマー足場などの足場又は三官能性リンカーを含むことがさらに好ましい。さらに、オフターゲット毒性を低減するために、細胞膜非透過性小分子毒素は、細胞膜透過性毒素より好ましいエフェクター分子である。

10

【0102】

好ましくは、効果がコンジュゲートによって含まれるサポニンによって強化される本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター部分は、コンジュゲートから脱離し、例えば、形質膜陥入するときにコンジュゲートの細胞表面分子標的化部分としてコンジュゲート中に存在するs d A bなどの抗体から脱離する。これは、例えば、酸性、還元的、酵素的又は光誘導性条件下で切断する切断可能な結合によって達成され得る。

【0103】

ある実施形態は、コンジュゲートが、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスードトクス及びポラツズマブベドチンに由来する少なくとも1つのs d A bを含むA D C、並びに／又はゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスードトクス及びポラツズマブベドチンのいずれか1つ以上において存在する毒素であり及び／若しくはジアンチン及びサポリンから選択される少なくとも1つのエフェクター分子を含むA D Cなどの抗体-薬物コンジュゲート（A D C）を含む本発明のコンジュゲートである。s d A bがそのようなヒト抗体に由来するとき、そのようなヒト抗体のV_Hドメインは、当技術分野で知られるドメイン安定性に関していくつかの改善（ヒトV_Hドメインの「ラクダ化」）を必要とする場合があることが理解されるであろう。

20

【0104】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、（群C）：

30

2 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

16 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

ヘデラゲニン（23-ヒドロキシオレアノール酸）；

16 アルファ，23-ジヒドロキシオレアノール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

プロトエシゲニン-21（2-メチルブタ-2-エノエート）-22-アセテート；

23-オキソ-バリングトゲノールC-21，22-ビス（2-メチルブタ-2-エノエート）；

23-オキソ-バリングトゲノールC-21（2-メチルブタ-2-エノエート）-16，22-ジアセテート；

40

ジギトゲニン；

3，16，28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン；

ギブソゲニン酸；又は

その誘導体

から選択されるアグリコンコア構造を含み、

好ましくは、少なくとも1つのサポニンが、キラ酸及びギブソゲニンから選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、少なくとも1つのサポニンが、アグリコンコア構造キラ酸を含む本発明のコンジュゲートである。

【0105】

50

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、サポニンのアグリコンコア構造（本明細書では「アグリコン」とも称される）におけるアルデヒド基（又はその誘導体）の存在は、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子のエンドソーム脱出を、そのようなサポニンが細胞中、前記細胞のエンドソーム中に本発明のコンジュゲートの一部としてこれらのエフェクター分子とともに共存するとき又は遊離形態でエンドソーム中にある（例えば、コンジュゲートが標的細胞エンドソーム又はリソソーム内部に送達されるとコンジュゲートから分離する）ときに刺激し及び／又は増強するサポニンの能力にとって有益である。したがって、アルデヒド基を伴うアグリコンを有するサポニンを含む本発明のコンジュゲートが好ましい。キラ酸及びギプソゲニンにおいて、アルデヒド基は、アグリコンのC₂₃原子にある。

10

【0106】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC₃原子又はC₂₈原子に結合された、好ましくは、C₃原子に結合された第1の糖鎖、及び少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC₂₈原子に結合された第2の糖鎖の一方又は両方を含み、好ましくは少なくとも1つのサポニンが、第1の糖鎖及び第2の糖鎖を含む本発明のコンジュゲートである。したがって、本発明のコンジュゲートによって含まれるサポニンが、2つのグリカン（糖鎖）を有するとき、第1の糖鎖は、アグリコンコア構造のC₃位で結合され、及び第2の糖鎖が、サポニンのアグリコンコア構造のC₂₈位で結合される。

【0107】

20

ある実施形態は、

・少なくとも1つのサポニンが、（群A）：

GlcA-

Glc-

Gal-

Rha-(1→2)-Ara-

Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-

Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-

Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-

Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-

30

Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-

Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-

40

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-

50

GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-\text{Glc-}(1\rightarrow2)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-\text{Gal-}(1\rightarrow2)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-\text{Gal-}(1\rightarrow2)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-\text{Glc-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-\text{Glc-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-\text{Gal-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、及び
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-\text{Gal-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}(1\rightarrow2)-$
 GlcA- 、及び

10

その任意の誘導体

から選択される第1の糖鎖を含み、

並びに／又は

・少なくとも1つのサポニンが、(群B)：

20

Glc- 、
 Gal- 、
 $\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{Xyl-}(1\rightarrow4)]-\text{Rha-}$ 、
 $\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{Ara-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)]-\text{Rha-}$ 、
 Ara- 、
 Xyl- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{R1-}(1\rightarrow4)]-\text{Fuc-}$ (式中、R1
 は、4 E-メトキシケイ皮酸である)、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{R2-}(1\rightarrow4)]-\text{Fuc-}$ (式中、R2
 は、4 Z-メトキシケイ皮酸である)、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Gal-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-4\text{-OAc-Fuc-}$
 c- 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-3,4\text{-ジ-OAc-Fuc-}$ 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{R3-}(1\rightarrow4)]$
 $]-3\text{-OAc-Fuc-}$ (式中、R3は、4 E-メトキシケイ皮酸である)、
 $\text{Glc-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)$
 $)-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、
 $\text{Glc-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、
 $(\text{Ara-又はXyl-})(1\rightarrow3)-(\text{Ara-又はXyl-})(1\rightarrow4)-(\text{Rha-}$
 $\text{又はFuc-})(1\rightarrow2)-[4\text{-OAc-(Rha-又はFuc-)}(1\rightarrow4)]-$
 (Rha-又はFuc-) 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-[\text{Qui-}(1\rightarrow4)]$
 $]-\text{Fuc-}$ 、
 $\text{Api-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)$
 $)-\text{Fuc-}$ 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Gal-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}$ 、
 $\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)-\text{Fuc-}$ 、
 $\text{Ara/Xyl-}(1\rightarrow4)-\text{Rha/Fuc-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc/Gal-}(1\rightarrow$
 $2)]-\text{Fuc-}$ 、
 $\text{Api-}(1\rightarrow3)-\text{Xyl-}(1\rightarrow4)-[\text{Glc-}(1\rightarrow3)]-\text{Rha-}(1\rightarrow2)$

30

40

50

50

シー 6-メチルーオクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチルーオクタン酸である)、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R 1 1 - (→ 3)] - F u c - (式中、R 1 1 は、5-O-[5-O-A r a / A p i - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチルーオクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチルーオクタン酸である)、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R 1 2 - (→ 3)] - F u c - (式中、R 1 2 は、5-O-[5-O-A r a / A p i - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチルーオクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチルーオクタン酸である)、

G l c - (1 → 3) - [G l c - (1 → 6)] - G a l -、及び
その任意の誘導体

から選択される第 2 の糖鎖を含む本発明のコンジュゲートである。

【0108】

したがって、本発明のコンジュゲートによって含まれるサポニンが、2つのグリカン（糖鎖）を有するとき、第 1 の糖鎖は、サポニンのアグリコンコア構造の C₃ 位で結合され、及び第 2 の糖鎖が、サポニンのアグリコンコア構造の C₂₈ 位で結合される。好ましくは、サポニンは、アグリコン中にアルデヒド基を有する。

【0109】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのサポニンが、それぞれ群 A 及び群 B に従って第 1 の糖鎖を含み及び第 2 の糖鎖を含み、第 1 の糖鎖が 2 個以上の糖部分を含み、及び第 2 の糖鎖が 2 個以上の糖部分を含み、アグリコンコア構造が、好ましくは、キラ酸又はギブソゲニン、より好ましくはキラ酸であり、

i . アグリコンコア構造中のアルデヒド基が誘導体化されている、

i i . 第 1 の糖鎖におけるグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている、及び

i i i . 第 2 の糖鎖における少なくとも 1 つのアセトキシ (M e (C O) O -) 基が誘導体化されている

の 1、2 又は 3 つ、好ましくは 1 つ又は 2 つである本発明のコンジュゲートである。

【0110】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのサポニンが、

i .

— アルコールへの還元；

— N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (E M C H) であって、E M C H のマレイミド基が、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成により任意選択により誘導体化される E M C H との反応を介するヒドラゾン結合への転換；

— N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (B M P H) であって、B M P H のマレイミド基が、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成により任意選択により誘導体化される B M P H との反応を介するヒドラゾン結合への転換；又は

— N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (K M U H) であって、K M U H のマレイミド基が、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成により任意選択により誘導体化される K M U H との反応を介するヒドラゾン結合への転換

によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造；

i i . 2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (A M P D) 又は N-(2-アミノエチル) マレイミド (A E M) との反応を介するアミド結合への転換によって誘導体化されているカルボキシル基、好ましくは、グルクロン酸部分のカルボキシル基を含む第 1 の糖鎖；

i i i . 脱アセチル化によるヒドロキシル基 (H O -) への転換によって誘導体化されているアセトキシ基 (M e (C O) O -) を含む第 2 の糖鎖；又は

i v . 2 つ又は 3 つの誘導体化 i . 、 i i . 及び / 又は i i i . の任意の組み合わせ、好ましくは、2 つの誘導体化 i . 、 i i . 及び / 又は i i i . の任意の組み合わせ

10

20

30

40

50

を含む本発明のコンジュゲートである。

【0111】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、キラヤ属 (*Quillaja*) 樹皮サポニン、ディブサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシドA、フィトラッカゲニン、エシン酸塩、AS6.2、NP-005236、AMA-1、AMR、アルファーヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AEX55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、SO1862、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xyl、QS-21B-apio、QS-21B-xyl、ベーターエスシン、エスシンIa、ティーシードサポニンI、ティーシードサポニンJ、アッサムサポニンF、ジギトニン、プリムラ酸1及びAS64R、若しくはその誘導体、若しくはその立体異性体、及び／又はその任意の組み合わせ、好ましくはQS-21又はQS-21誘導体、SO1861又はSO1861誘導体、SA1641又はSA1641誘導体及びGE1741又はGE1741誘導体のいずれか1つ以上、より好ましくはQS-21誘導体又はSO1861誘導体、最も好ましくはSO1861誘導体、例えば、本発明によるサポニン誘導体のいずれか1つ以上である本発明のコンジュゲートである。

【0112】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21A-apio、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-apio、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナムアルBUM (*Saponinum album*)、QS-18、Quil-A、Gyp1、ギブソシドA、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、若しくはその誘導体、若しくはその立体異性体、及び／又はその任意の組み合わせのいずれか1つ以上であり、好ましくは、サポニン誘導体が、SO1861誘導体及び／又はGE1741誘導体及び／又はSA1641誘導体及び／又はQS-21誘導体であり、より好ましくは、サポニン誘導体が、SO1861誘導体又はQS21誘導体であり、最も好ましくは、サポニン誘導体が、本発明によるSO1861誘導体である本発明のコンジュゲートである。

【0113】

そのようなトリテルペングリコシド型のサポニンは、コンジュゲートによって含まれ、及び細胞のエンドソーム (又はリソソーム) に存在するエフェクター分子のエンドソーム脱出を、コンジュゲートの一部としての又は遊離形態のサポニンが細胞内部のそのようなエフェクター分子と共存するときに強化することができる。本発明者らは、これらのサポニンのエンドソーム脱出強化活性が、サポニンが本発明のコンジュゲートの一部として細胞と接触されるときに約100~1000倍を超えて強力であることを確立した。遊離サポニンは、細胞の細胞質ゾル中のエフェクター分子の送達を、そのような細胞が、ADC又はAOCなどのある特定の細胞標的化コンジュゲートの一部としてのエフェクター分子、及びサポニンと接触されるとき、標的細胞の外部からエンドソーム内部及び最終的には前記細胞の細胞質ゾルへのエフェクター分子の同じ程度の送達を達成するのに要求される本発明のコンジュゲートによって含まれる同じサポニンの濃度と比較して100~1000倍高いサポニン濃度で刺激することができる。そのようなエンドソーム脱出強化活性を示すサポニン、及びコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の細胞質ゾル送達

を増強する能力が確立されているサポニンと高い構造的類似性を有するサポニンは表 A 1 において列挙される。したがって、サポニンが本発明のコンジュゲートの一部であるとき、コンジュゲートの s d A b の結合時、標的細胞上の標的化される細胞表面結合部位への結合時、前記細胞への結合時、及びエンドサイトーシスの後、前記細胞のエンドソーム中へのサポニンの標的化された送達は、同じ細胞を標的細胞の細胞表面分子への結合のための抗体又は s d A b などの結合分子とともに提供されない遊離の標的化されないサポニン（誘導体）と接触させることと比較して約 1 0 0 ～ 1 0 0 0 倍効果的である。

【 0 1 1 4 】

例えば、I g G 型の抗体、又は F a b、s c F v などのその断片と比較して小さいサイズの本発明のコンジュゲートの s d A b は、コンジュゲートによって含まれる s d A b の結合のための結合部位を露出する標的細胞による効率的な取り込み、例えば、エンドサイトーシスによる取り込みに寄与する。通常、本発明のコンジュゲートにおける s d A b は、腫瘍細胞特異的細胞表面受容体などの標的細胞の細胞表面受容体に結合することができる。このようにして、本発明のコンジュゲートは、例えば、細胞表面受容体を発現する腫瘍細胞へのエンドサイトーシスに特に好適である。

【 0 1 1 5 】

ある実施形態は、少なくとも 1 つの s d A b が、細胞の細胞表面分子に結合するための s d A b を含み、細胞が、腫瘍細胞、自己免疫細胞、ウイルス感染細胞などの感染細胞、又は遺伝子欠損若しくは酵素欠損を含む細胞などの異常な細胞である本発明のコンジュゲートである。

【 0 1 1 6 】

ある実施形態は、少なくとも 1 つの s d A b が、細胞の細胞表面分子に結合するための s d A b であって、免疫グロブリン：I g G 型 O K T - 9 などの抗 C D 7 1 抗体、トラストズマブ（ハーセプチン）、ペルツズマブなどの抗 H E R 2 抗体、リツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、オビヌツズマブイブリツモマブなどの抗 C D 2 0 抗体、オレゴボマブなどの抗 C A 1 2 5 抗体、エドレコロマブなどの抗 E p C A M（1 7 - 1 A）抗体、セツキシマブ、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツズマブなどの抗 E G F R 抗体、ブレソツキシマブなどの抗 C D 3 0 抗体、ゲムツズマブ、h u M y 9 - 6 などの抗 C D 3 3 抗体、エタラシズマブなどの抗血管性インテグリンアルファ - v ベータ - 3 抗体、アレムツズマブなどの抗 C D 5 2 抗体、エブラツズマブ、ピナツズマブなどの抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 2 2 抗体モキセツモマブの結合断片（F v）、ヒト化モノクローナル抗体イノツズマブ、ラベツズマブなどの抗 C E A 抗体、ビバツズマブなどの抗 C D 4 4 v 6 抗体、シプロツズマブなどの抗 F A P 抗体、h u B 4 などの抗 C D 1 9 抗体、h u C 2 4 2 などの抗 C a n A g 抗体、h u N 9 0 1 などの抗 C D 5 6 抗体、ダラツムマブなどの抗 C D 3 8 抗体、O K T - 1 0 抗 C D 3 8 モノクローナル抗体、D S 6 などの抗 C A 6 抗体、シズツムマブなどの抗 I G F - 1 R 抗体、3 B 7、C N T O 9 5 などの抗インテグリン抗体、B - B 4 などの抗シンデカン - 1 抗体、ポラツズマブなどの抗 C D 7 9 b、抗 H I V g p 4 1 抗体のいずれか 1 つ以上、好ましくは、抗 H I V g p 4 1 抗体、抗 C D 7 1 抗体、抗 H E R 2 抗体及び抗 E G F R 抗体のいずれか 1 つ、より好ましくは、トラストズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、マツズマブ、抗 C D 7 1 抗体、O K T - 9、最も好ましくは、トラストズマブ、セツキシマブ、抗 C D 7 1 抗体 O K T - 9 のいずれか 1 つに由来するか又は基づく s d A b を含む本発明のコンジュゲートである。

【 0 1 1 7 】

これらの細胞表面分子は通常、少なくともある特定の程度で腫瘍細胞特異性を有する腫瘍細胞上に存在する。腫瘍細胞特異性は、これらの受容体を本発明のコンジュゲートのための好適な標的にし、したがって、コンジュゲートにおける s d A b は、そのような細胞表面受容体に結合することができる。本発明のコンジュゲートによって含まれるサポニンは、本発明のコンジュゲートによって含まれる s d A b によって標的化される（腫瘍）細胞などの細胞の細胞質ゾルにおける本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の放出及び送達を刺激することができるため、例えば、A D C 及び A O C のための

10

20

30

40

50

標的として機能するためのその適合性に関して知られる細胞表面受容体である s d A b のための標的（腫瘍）細胞表面分子として選択することが特に好適である。それとともに、本発明のコンジュゲートは、コンジュゲートの一部であるエフェクター分子の、本発明の全く同じコンジュゲートによって含まれるサポニンと合わせた同時送達に好適であり、そのコンジュゲートは、s d A b を含み及びサポニンを含む改良型 A D C 又は改良型 A O C である。本発明のコンジュゲートで腫瘍細胞特異的な受容体を標的化することによって、標的細胞エンドソーム及び／又はリソソームへのコンジュゲートの一部としてのサポニンのエンドサイトーシス及び送達を促進する。腫瘍細胞が本発明のコンジュゲートと接触されるとき、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子は、エンドソーム又はリソソームに同時送達され、共存したサポニンの影響下で、引き続いてエフェクター分子が標的細胞の細胞質ゾルに移行させられる。本明細書で先に説明されるとおり、本発明のコンジュゲートの一部としての標的化サポニンの適用は、受容体リガンド、抗体又は s d A b などの細胞標的化結合分子を欠く遊離サポニンの適用と比較して、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の生物活性が考慮されるとき、サポニンの増強効果の約 100 倍～1000 倍の改善をもたらす。

【0118】

本発明のコンジュゲートにおけるラクダ類 V_H などの小さい s d A b の適用は、抗体に基づく A D C について一般的に観察されるクリアランス速度と比較して、コンジュゲートが投与されたヒト対象の血行から及び身体からの本発明のコンジュゲートのクリアランスを妨げるか又は遅くする。加えて、相対的に小さいサイズの s d A b に起因して、連結されたタンパク質ドメインの存在に起因する標的細胞内部のサポニン活性を制限するか又は妨害するためのリスクは、より大きいサイズの、例えば、抗体と比較して、そのような抗体がサポニンに結合されるときに制限される。一般に、サポニンに連結された分子のサイズが小さいほど、結合される分子、例えば、V_HH などの s d A b の存在に起因する細胞内部のサポニン活性との干渉のリスクが小さくなる。さらに、相対的に小さいサイズの s d A b は、腫瘍組織などの組織中における迅速な分布をもたらす、例えば、A D C、O A C において一般的に適用される相対的に大きなサイズの I g G と比較して、本発明のコンジュゲートによる標的細胞への到達の改善を可能にし、それとともに標的細胞への結合（の程度）の改善を可能にしている。本発明のコンジュゲートにおいて s d A b を適用する多くの利点の 1 つは、例えば、I g G 型の通常の抗体に共通する F c テイルの欠如である。本発明のコンジュゲートにおける s d A b の F c テイルの欠如は、コンジュゲートが必要とする患者に投与されるとき、F c γ-受容体活性化に関連する望まれない副作用などの F c γ-受容体媒介性オプターゲット効果の発生を予防する。F c テイルの欠如は、例えば、抗体に基づく A D C が投与される患者の細胞への F c の結合によって生成される副作用のリスクを排除する。本発明の s d A b を含むコンジュゲートは、F c に媒介される望まれない副作用のこのリスクを有しない。

【0119】

ある実施形態は、少なくとも 1 つのエフェクター分子が、少なくとも 1 つの s d A b、好ましくは、少なくとも 1 つの s d A b のうちの 1 つ及び／若しくは少なくとも 1 つのサポニンのうちの少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つにリンカーを介して共有結合されるか若しくは s d A b 及び／若しくはサポニンに直接的に共有結合され、並びに／又は少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの s d A b、好ましくは、少なくとも 1 つの s d A b のうちの 1 つ及び／若しくは少なくとも 1 つのエフェクター分子、好ましくは、少なくとも 1 つのエフェクター分子のうちの 1 つにリンカーを介して共有結合されるか若しくは s d A b 及び／若しくはエフェクター分子に直接的に共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0120】

ある実施形態は、コンジュゲートが、少なくとも 1 つの s d A b、少なくとも 1 つのサポニン及び少なくとも 1 つのエフェクター分子の各々が、好ましくは別々に、直接的に、又はリンカーを介して三官能性リンカーに共有結合された三官能性リンカーを含み、好ま

しくは、コンジュゲートが、1つのs d A b、少なくとも1つのサポニン及び少なくとも1つ、好ましくは、1つのエフェクター分子が別々に、直接的に、又はリンカーを介して三官能性リンカーに共有結合された三官能性リンカーを含む本発明のコンジュゲートである。

【0121】

リンカーを介するs d A b及び／又はエフェクター分子へのサポニンのカップリングは、s d A b及び／又はエフェクター分子へのサポニンのカップリングのための結合部位が考慮されるときに柔軟性をもたらす。さらに、そのようなリンカーは、s d A bとサポニンとエフェクター分子の間にスペーサーとして作用してもよく、その結果、s d A bは、細胞表面分子上の結合部位に結合するその能力を維持し、サポニンは、コンジュゲートによって含まれるエフェクター分子のエンドソーム脱出を強化するその能力を維持し、エフェクター分子は、その細胞内結合パートナーに対するその生物活性を維持する。

10

【0122】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、少なくとも1つのs d A bの1つ及び／又は少なくとも1つのエフェクター分子の1つにおけるスルフヒドリル基に対するチオエーテル結合を介して共有結合され、その共有結合が、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造のC₂₃位におけるアルデヒド基に共有結合され及びシステインのスルフヒドリル基などのs d A b及び／又はエフェクター分子におけるスルフヒドリル基に共有結合されるリンカーN-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）を介するものである本発明のコンジュゲートである。

20

【0123】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、C₂₃位においてアルデヒド官能基を任意選択により有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及びサポニンのアグリコンコア構造のC₃ベーターOH基で結合される第1の糖鎖においてグルクロン酸単位を含むバイーデスモサイドトリテルペンサポニン又はその誘導体であり、サポニンが、第1の糖鎖におけるグルクロン酸単位のカルボキシル基を介して、好ましくは、リンカーを介して少なくとも1つのs d A b及び／又は少なくとも1つのエフェクター分子のアミノ酸残基に共有結合され、アミノ酸残基が、好ましくは、システイン及びリジンから選択される本発明のコンジュゲートである。

30

【0124】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、サポニンのアグリコンコア構造のC₃ベーターOH基での第1の糖鎖においてグルクロン酸単位を含み、グルクロン酸単位がリンカーに共有結合され、リンカーが、好ましくは、s d A b及び／又はエフェクター分子のリジン又はN末端のアミン基などの少なくとも1つのs d A b及び／又は少なくとも1つのエフェクター分子におけるアミン基にアミド結合を介して共有結合され、好ましくは、前記リンカーが、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3-トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート（HATU）である本発明のコンジュゲートである。

【0125】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンの2つ以上の共有結合されたサポニン部分、好ましくは、そのような部分の2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128若しくは1~100個、又は7、9、12個のサポニン部分などのその間の任意の数のそのような部分を含む本発明のコンジュゲートである。

40

【0126】

ある実施形態は、2つ以上の共有結合されたサポニン部分が、少なくとも1つのs d A b及び／若しくは少なくとも1つのエフェクター分子のアミノ酸残基に、好ましくは、システイン及び／若しくはリジンに直接的に共有結合され、並びに／又はリンカー及び／若しくは切断可能なリンカーを介して共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0127】

ある実施形態は、分子構造（II）：

50

(サポニン－リンカー) a 免疫グロブリン－エフェクター部分

(構造 (I I))

(式中、 $a = 1 \sim 4$ 、好ましくは、1、2、4であり、及び免疫グロブリンは、好ましくは、 $s d A b$ である)の分子形式を本質的に有するか

又は分子構造 (I I I) :

(サポニン－デンドロン (－サポニン) x) b －免疫グロブリン－エフェクター部分

(構造 (I I I))

(式中、 $x = 1 \sim 100$ 、好ましくは、 $1 \sim 63$ 、 $1 \sim 31$ 、 $1 \sim 15$ 、 $1 \sim 7$ 、又は3 ; $b = 1 \sim 4$ 、好ましくは、1、2、4であり、及び免疫グロブリンは、好ましくは、 $s d A b$ である)の分子形式を本質的に有するか

又は分子構造 (I V) :

(サポニン－三官能性リンカー (－エフェクター部分)) c －免疫グロブリン

(構造 (I V))

(式中、 $c = 1 \sim 4$ 、好ましくは、1、2、4であり、及び免疫グロブリンは、好ましくは、 $s d A b$ である)の分子形式を本質的に有するか

又は分子構造 (V) :

((サポニン－デンドロン (－サポニン) y)－三官能性リンカー (－エフェクター部分)) d －I g

(構造 (V))

(式中、 $y = 1 \sim 100$ 、好ましくは、 $1 \sim 63$ 、 $1 \sim 31$ 、 $1 \sim 15$ 、 $1 \sim 7$ 、又は3 ; $d = 1 \sim 4$ 、好ましくは、1、2、4であり、及び免疫グロブリン (「I g」) は、好ましくは、 $s d A b$ である)の分子形式を本質的に有する本発明によるエンドソーム及び／又はリソソーム脱出強化コンジュゲートである。

【0128】

好ましくは、 x 又は y は、3、7 又は 15 である。好ましくは、 b 又は d は、1、2 又は 4 であるが、いくつかの実施形態では、 b 又は d は、3 であり、免疫グロブリンが、 V_{HH} などの $s d A b$ であるとき、 a は、好ましくは、1 であり、 b は、好ましくは、1 であり、 c は、好ましくは、1 であり、 d は、好ましくは、1 である。デンドロンは、例えば、G4 デンドロン又は G5 デンドロンである。好ましくは、サポニンは、 < 6.5 の pH 条件 (すなわち、エンドソーム、エンドリソソーム、リソソーム中の pH) 下にて細胞内で切断されるヒドラゾン結合などの切断可能な結合を介してリンカーに結合される。好ましくは、リンカーは、EMCH である。好ましくは、三官能性リンカーは、本明細書の下で示されるとおりの構造 A を有するリンカーである。構造 I I 及び I I I に関して、好ましくは、エフェクター部分は、切断可能なリンカーなどのリンカーを介して I g に結合される。

【0129】

ある実施形態は、2 つ以上の共有結合されたサポニン部分が、少なくとも 1 つのオリゴマー分子又はポリマー分子及びそれに共有結合された 2 つ以上のサポニンを含む共有結合性サポニンコンジュゲートの一部であり、共有結合性サポニンコンジュゲートが、少なくとも 1 つの $s d A b$ の少なくとも 1 つ及び／又は少なくとも 1 つのエフェクター分子の少なくとも 1 つに共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0130】

そのような共有結合性サポニンコンジュゲートは、複数のサポニン部分のための担体として機能し、これは、単結合を介して、好ましくは (切断可能な) リンカーを介してコンジュゲートによって含まれる $s d A b$ に結合され得る。共有結合性サポニンコンジュゲートは、これらのサポニンを共有結合的に連結するための結合部位を含む選択されたオリゴマー又はポリマー構造の型に関連する $1 \sim 200$ 個のサポニン部分などの任意の選択された数の共有結合されたサポニン部分を有し得るため、そのような共有結合性サポニンの適用は、本発明のコンジュゲートにおけるサポニン部分の数が考慮されるときに自由度を提供する。例えば、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の細胞質ゾ

10

20

30

40

50

ル送達に関して、本発明のコンジュゲート中に存在するサポニンの数は、共有結合性サポニンコンジュゲートが本発明のコンジュゲートの一部であるとき、及びエフェクター分子が、エフェクター分子がその生物活性を発揮するべきである標的細胞のエンドソーム又はリソソームにおける全く同じコンジュゲートの複合的な部分としてサポニンと共存するとき、エフェクター分子の細胞質ゾル送達を刺激するのに足りており及び十分ないくつかのサポニン部分を有する共有結合性サポニンコンジュゲートを提供することによって適応させられ得る。

【0131】

好ましくは、1～8個の共有結合性サポニンコンジュゲートが、より好ましくは2～4個のそのような共有結合性サポニンコンジュゲートが、s d A b及び／又はエフェクター分子に結合され、少なくとも1つの共有結合性サポニンコンジュゲートは、任意選択により、デンドロンに基づき、任意選択により、1～32個のサポニン部分、好ましくは、2、3、4、5、6、8、10、16、32個のそのような部分、又は7、9、12個のサポニン部分などのその間にある任意の数のそのような部分は、直接的に又はリンカーを介して、少なくとも1つの共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子に共有結合される。

【0132】

好ましくは、共有結合性サポニンコンジュゲートの1又は2つは、本発明のコンジュゲート中の単一のs d A bに結合される。多くの目的のために、コンジュゲートによって含まれる単一のs d A bへの単一のサポニンのカップリング又は単一の共有結合性サポニンコンジュゲートのカップリングは、標的細胞及び前記細胞の細胞質ゾルへのエフェクター分子の送達の効率的な刺激のために十分であり、エフェクター分子は、本発明のコンジュゲートによって含まれる。通常、4、8又は16個のサポニンは、本発明のコンジュゲート中のs d A bにカップリングされた単一の共有結合性サポニンコンジュゲートによって含まれる4又は8個のサポニンなどの本発明のコンジュゲートによって含まれる。通常、本発明のそのようなコンジュゲートは、1つ又は複数のサポニン又は共有結合性サポニンコンジュゲートが結合される単一のs d A bを含み、好ましくは、単一のサポニン又は単一の共有結合性サポニンコンジュゲートは、コンジュゲートの一部である。

【0133】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、切断可能なリンカーを介して少なくとも1つのs d A bの少なくとも1つ及び／又は少なくとも1つのエフェクター分子の少なくとも1つに共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0134】

ある実施形態は、切断可能なリンカーが、酸性条件、還元的条件、酵素的条件及び／又は光誘導性条件下で切断にかけられ、好ましくは、切断可能なリンカーが、酸性条件下で切断にかけられるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／又はタンパク質分解、例えば、カテプシンBによるタンパク質分解に影響されやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元的条件下で切断されやすい結合から選択される切断可能な結合を含む本発明のコンジュゲートである。

【0135】

ある実施形態は、切断可能なリンカーが、例えば、哺乳動物細胞、好ましくは、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下、好ましくは、pH 4.0～6.5、より好ましくは、pH ≤ 5.5でインビボでの切断にかけられる本発明のコンジュゲートである。

【0136】

エンドソーム及びリソソームに見られるような条件下で切断可能なリンカーであるそのような切断可能なリンカーは、本発明のコンジュゲートの残部からのサポニンの切断（分離）時にエンドソーム又はリソソーム内部への遊離サポニンの送達を促進する。このように、本発明のコンジュゲートは、エンドソーム（又はリソソーム）から標的細胞の細胞質ゾルへの本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の送達を刺激し及び

／又は促進する遊離サポニンの能力に寄与する、標的細胞上の細胞表面分子への s d A b の特異的結合時のサポニンの細胞標的化送達の利点、及び細胞内、すなわち、エンドソーム（又はリソソーム）内部での遊離サポニンの存在の利点を組み合わせている。

【0137】

ある実施形態は、共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子が、少なくとも1つの s d A b の少なくとも1つ及び／又は少なくとも1つのエフェクター分子の少なくとも1つに、好ましくは、s d A b 及び／又はエフェクター分子のアミノ酸残基に共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0138】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、本発明による切断可能なリンカーを介して共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子に共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0139】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、イミン結合、ヒドラゾン結合、ヒドラジド結合、オキシム結合、1,3-ジオキサラン結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、アミド結合、ペプチド結合又はエステル結合のいずれか1つ以上を介して、好ましくはリンカーを介して、共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子に共有結合される本発明のコンジュゲートである。

【0140】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、C₂₃位におけるアルデヒド官能基を含むアグリコンコア構造を含み、及び少なくとも1つのサポニンが、任意選択により、サポニンのアグリコンコア構造のC₃ベーターOH基で第1の糖鎖においてグルクロン酸官能基を含み、アルデヒド官能基が、共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子への共有結合に関与し、及び／又は存在する場合、グルクロン酸官能基が、直接的な共有結合を介する、又はリンカー（リンカーは、切断可能なリンカー又は安定なリンカーである）を介するサポニンの結合である共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子に対する共有結合に関与する本発明のコンジュゲートである。本明細書では、安定とは、サポニンと s d A b 又はエフェクター分子の間の結合、又はサポニンとオリゴマー又はポリマー構造の間の結合を指し、この結合は、細胞内の酸性条件、特に、そのような細胞のエンドソーム又はリソソーム内の酸性条件下で未変化のままである（切断されない）。加えて、そのような安定な結合は、例えば、共有結合性サポニンコンジュゲートを含む本発明のコンジュゲートが投与されるヒト対象の血行及び器官において未変化のままである（すなわち、切断されない）。対照的に、コンジュゲートによって含まれる s d A b 又はエフェクター分子へのサポニンの結合に関連して切断可能なリンカー、又はオリゴマー構造若しくはポリマー構造は、ヒト細胞、例えば、腫瘍細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソーム内部で見られるとおりの酸性条件下で切断される結合を指すが、そのような切断可能なリンカーは、そのような切断可能な結合を含むコンジュゲートが、血行又は器官中、すなわち、例えば、本発明のコンジュゲートが投与されるヒト対象の細胞の外部に存在するときに未変化のままである（切断されない）。

【0141】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC₂₃位におけるアルデヒド官能基が、リンカー E M C H に共有結合され、E M C H が、システインのスルフヒドリル基などの共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子におけるスルフヒドリル基に対するチオエーテル結合を介して共有結合される本発明のコンジュゲートである。サポニンのアグリコンのアルデヒド基への E M C H リンカーの結合は、ヒドラゾン結合の形成をもたらす。そのようなヒドラゾン結合は、エンドソーム及びリソソーム内の酸性条件下で切断可能な結合の典型的な例である。本発明のコンジュゲートによって含まれる s d A b 若しくは本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子、又は共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー構造若しくはポリマー

10

20

30

40

50

構造にカップリングされるサポニンであって、そのような共有結合性サポニンコンジュゲートは、コンジュゲートの s d A b 又はエフェクター分子にカップリングされ、コンジュゲートの s d A b が結合することができる細胞表面分子を露出する標的細胞のエンドソーム又はリソソームにおいて送達されると本発明のコンジュゲートから遊離可能である。このように、本発明のコンジュゲートにおける s d A b 又はエフェクター分子にカップリングされたサポニンは、細胞の外部からエンドソーム（又はリソソーム）に移行させられ、エンドソーム（又はリソソーム）において、サポニンは、ヒドラゾン結合の pH に駆動される切断時にコンジュゲートの残部から遊離される。エンドソーム（又はリソソーム）において、遊離サポニンは、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター分子の細胞質ゾルへの送達が考慮されるときにその刺激活性を発揮することができる。驚くべきことに、本発明者らは、サポニンに関して、サポニンが遊離形態でエンドソーム又はリソソーム中に存在することはサポニンのエンドソーム脱出強化活性に必須ではないことを確立した。また、例えば、ある特定のコンジュゲートによって含まれるサポニンは、ある特定のコンジュゲートの一部としてのエフェクター分子及びサポニンの両方が同じ標的細胞と接触されると、エンドソーム／リソソームから標的化される細胞の細胞質ゾルへのエフェクター分子の送達を増強している。

【0142】

ある実施形態は、サポニンのアグリコンコア構造の C₃ ベーター OH 基での第 1 の糖鎖におけるグルクロン酸官能基が、リンカー H A T U に共有結合され、H A T U が、タンパク質のリジン又は N 末端のアミン基などの共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子におけるアミン基に対するアミド結合を介して共有結合される本発明のコンジュゲートである。H A T U リンカーが本発明のコンジュゲートのサポニン及び s d A b 又はエフェクター分子にカップリングされるとき、サポニンは、例えば、s d A b 又はエフェクター分子の N 末端（そのようなエフェクター分子がタンパク質毒素などのタンパク質性エフェクター分子である場合）又は s d A b 中に存在するか又はエフェクター分子中に存在するリジンのアミン基に結合される。

【0143】

ある実施形態は、共有結合性サポニンコンジュゲートのポリマー分子又はオリゴマー分子が、少なくとも 1 つの s d A b の少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ、及び／又は少なくとも 1 つのエフェクター分子の少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つに、好ましくは s d A b のアミノ酸残基及び／又はエフェクター分子のアミノ酸残基に結合され、共有結合性サポニンコンジュゲートのポリマー分子又はオリゴマー分子上のクリックケミストリー基を含み、クリックケミストリー基が、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン若しくはアルキン、又はこれらの基の環状誘導体から選択され、より好ましくは、クリックケミストリー基が、アジドである本発明のコンジュゲートである。

【0144】

ある実施形態は、共有結合性サポニンコンジュゲートのポリマー分子又はオリゴマー分子が、直鎖状ポリマー、分岐状ポリマー及び／又は環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、DNA、ポリペプチド、ポリーリジン、ポリーエチレングリコール、O E G₃、O E G₄ 及び O E G₅ などのオリゴエチレングリコール（O E G）、又は集合体が好ましくは共有結合的な架橋によって構築されるこれらのポリマー構造及び／又はオリゴマー構造の集合体から選択されるポリマー構造及び／又はオリゴマー構造を含み、好ましくは、共有結合性サポニンコンジュゲートのポリマー分子又はオリゴマー分子がポリーアミドアミン（P A M A M）デンドリマーなどのデンドロンである本発明のコンジュゲートである。本発明のコンジュゲートにおいて組み込まれることになる選択されたサポニンの数によって駆動されるため、オリゴマー構造又はポリマー構造の型及びサイズ又は長さが選択される。すなわち、本発明のコンジュゲートの形成のためのコンジュゲートによって含まれる s d A b 又はエフェクター分子にカップリングされることになるサポニンの数は、所望の数のサポニンをカップリングするための十分な量の結合部位を有する好適なオリゴマー又はポリマー構造の選択を

10

20

30

40

50

決定することができ、それとともに、本発明のコンジュゲートの提供のため s d A b 又はエフェクター分子にカップリングされることになる選択された数のサポニン部分を有する共有結合性サポニンコンジュゲートを提供することができる。例えば、O E G の長さ又はデンドロン若しくはポリーリジン分子のサイズは、そのようなオリゴマー又はポリマー構造に共有結合的に連結され得るサポニンの最大数を決定する。

【0145】

したがって、本発明によるコンジュゲートは、少なくとも1つのサポニンを含む。これに関連して「少なくとも1つ」は、コンジュゲートが1つのサポニン分子を含むが、一対（例えば、2、3又は4個）のサポニン又は多数（例えば、10、20又は100個）のサポニンも含む場合があることを意味する。適用に応じて、コンジュゲートは、共有結合されたサポニンを有する共有結合された足場（共有結合性サポニンコンジュゲート）を含んでもよく、足場は、それが定義された数のサポニンを含むように設計されてもよい。好ましくは、本発明によるコンジュゲートは、無作為な数ではなく定義された数又は範囲のサポニンを含む。これは、販売承認に関連する薬物開発のために特に有利である。これに関する定義された数は、コンジュゲートが好ましくは、前に定義された数のサポニンを含むことを意味する。これは、例えば、サポニンが結合するためのある特定の数の可能な部分を有するポリマー構造を含む足場を設計することによって達成される。理想的な状況下で、これらの部分の全ては、サポニンにカップリングされ、足場は前に定義された数のサポニンを含む。例えば、2、4、8、16、32、64などのサポニンを含む足場の標準的なセットを提供し、最適な数が使用者の必要に応じて使用者によって容易に試験され得ることが想定される。ある実施形態は、本発明の足場を含む本発明のコンジュゲート（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）であり、サポニンは、例えば、理想的ではない状況下では、ポリマー構造中に存在する全ての部分がサポニンに結合するわけではないため、定義された範囲に存在する。そのような範囲は、例えば、足場当たり2～4個のサポニン分子、足場当たり3～6個のサポニン分子、足場当たり4～8個のサポニン分子、足場当たり6～8個のサポニン分子、足場当たり6～12個のサポニン分子などであり得る。したがって、そのような場合、本発明による足場を含むコンジュゲートは、範囲が2～4として定義される場合、2、3又は4個のサポニンを含む。

【0146】

足場は、足場に共有結合されるサポニンの型に基本的に依存せず、足場はその後（順次）コンジュゲートに共有結合的にカップリングされる。したがって、足場を含む本発明のコンジュゲート（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）は、プラットフォーム技術のための基礎製品である。少なくとも1つの共有結合されたサポニンは、本発明のコンジュゲートによって含まれる細胞表面分子標的化 s d A b に結合されたエフェクター分子の細胞内送達を媒介するため、本発明による足場技術は、サポニンによる制御された細胞内へのエフェクター部分の送達を媒介するシステムである。足場は、s d A b における単一の定義された位置でコンジュゲートによって含まれるサポニン及び細胞表面分子標的化 s d A b に連結され得る最適化された機能的に活性な単位を提供する。

【0147】

ある実施形態は、ポリマー又はオリゴマー構造の単量体の数が正確に定義された数又は範囲である本発明による足場を含む本発明のコンジュゲート（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）である。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、ポリ（アミン）、例えば、ポリエチレンジアミン及びポリ（アミドアミン）などの構造、又はポリエチレングリコール、ポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド-コ-グリコリドコポリマー、ポリ（デキストリン）などのポリ（エステル）、又はペプチド若しくはタンパク質などの構造、又は天然及び／又は人工ポリアミノ酸、例えば、ポリーリジン、DNA ポリマー、安定化RNAポリマー又はPNA（ペプチド核酸）ポリマーを含み、直鎖状、分岐状又は環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー又は純粋な若しくは混合されたこれらの構造の集合体として現れる。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、生体適合性であり、生体適合性は

、ポリマー又はオリゴマー構造が、生物体において実質的な急性又は慢性毒性を示さず、そのまま排出されるか又は身体の代謝により排出可能な化合物及び／又は生理的化合物に完全に分解できることを意味する。集合体は、共有結合性の架橋若しくは非共有結合及び／又は引力によって構築され得る。したがって、それらはまた、ナノゲル、マイクロゲル、又はヒドロゲルを形成することができるか、又はコレステロール及び／若しくはリン脂質を含む無機ナノ粒子、コロイド、リポソーム、ミセル又は粒子様構造などの担体に結合することができる。前記ポリマー又はオリゴマー構造は、好ましくは、グリコシド分子（及び／又はエフェクター分子及び／又はリガンド、モノクローナル抗体若しくはs d A bなどのその断片などの担体分子）のカップリングのための正確に定義された数又は範囲のカップリング部分（化学基）を有する。ポリマー又はオリゴマー構造におけるカップリング部分（化学基）の正確に定義された数又は範囲の好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは（約）100%が、本発明による足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）におけるグリコシド分子（本発明のサポニン）によって占有される。

【0148】

好ましくは、デンドロンは、フォーカルポイントと呼ばれる木の起点で単一の化学的にアドレス指定できる基を有する分岐状の明確に定義された樹木状ポリマーである。デンドリマーは、2つ以上のデンドロンをそれらのフォーカルポイントで連結したものである。デンドロン化ポリマーは、1つ以上のデンドロンのフォーカルポイントがポリマーに連結されたものである。好ましい実施形態では、本発明による足場が提供され、ポリマー又はオリゴマー構造は、直鎖状、分岐状若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー又は純粋な若しくは混合されたこれらの構造の集合体を含み、集合体は、共有結合性架橋又は非共有結合性引力によって構築することができ、及びナノゲル、マイクロゲル、又はヒドロゲルを形成することができ、及び好ましくは、ポリマーは、ポリ（アミン）の誘導体、例えば、ポリエチレンジアミン及びポリ（アミドアミン）、並びにポリエチレングリコール、ポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド-コグリコリドコポリマー、及びポリ（デキストリン）などのポリ（エステル）などの構造、並びにポリ-リジン、又はペプチド若しくはタンパク質などの天然及び／若しくは人工ポリアミノ酸又はDNAポリマー、安定化RNAポリマー又はPNA（ペプチド核酸）ポリマーなどの構造である。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、生体適合性である。

【0149】

ある実施形態は、少なくとも1つのサポニンが、三官能性リンカー、好ましくは、構造A：

【0150】

10

20

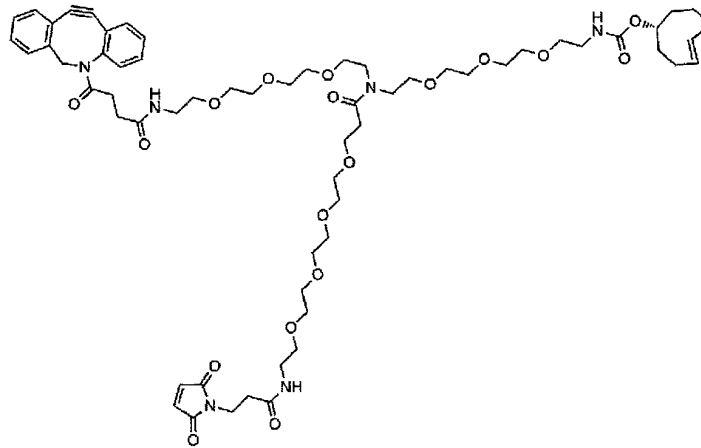
30

40

50

【化 1】

(構造A)



10

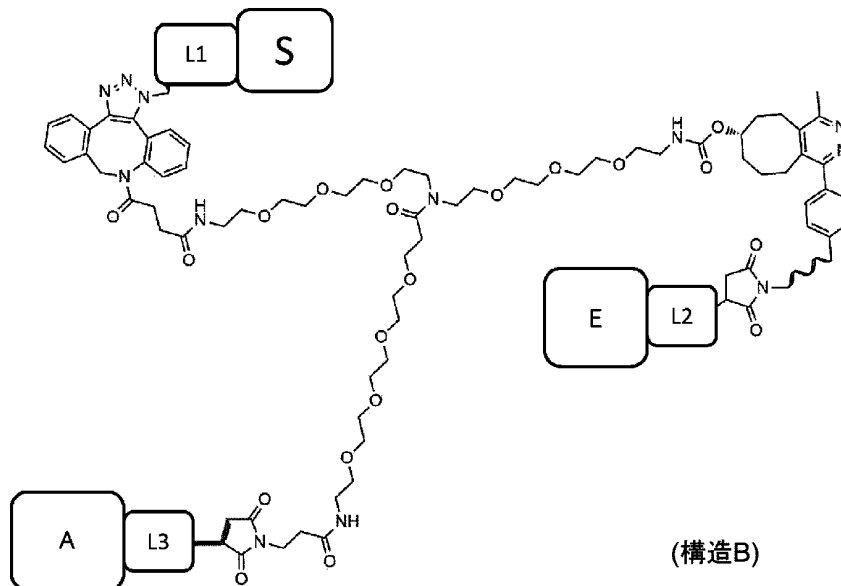
【0151】

によって表される三官能性リンカーを介して少なくとも1つのs d A bの少なくとも1つ、好ましくは1つに共有結合され、及び少なくとも1つのエフェクター分子の少なくとも1つ、好ましくは1つに共有結合され、
 コンジュゲートが、好ましくは、構造Aの三官能性リンカーを含み、及び構造B：

20

【0152】

【化 2】



(構造B)

30

【0153】

によって表される分子構造を有し、
 Sが、本発明による少なくとも1つのサポニン又は共有結合性サポニンコンジュゲートであり、Eが、少なくとも1つ、好ましくは1つのエフェクター分子であり、Aが、単一のs d A bなどの少なくとも1つのs d A bであり、L1、L2及びL3がそれぞれ個別に、それぞれ三官能性リンカー及びサポニン又は共有結合性サポニンコンジュゲート、エフェクター分子及びs d A b間の結合であるか、又はL1、L2及びL3がリンカー（L1、L2及びL3は、同じであるか又は異なる）である本発明のコンジュゲートである。

40

【0154】

別段の指示がない限り、本発明のサポニンのエンドソーム脱出機構に関連する場合は特

50

に、「エンドソーム」又は「エンドソーム脱出」という用語が本明細書で使用される場合は常に、それはエンドリソソーム及びリソソーム、並びにそれぞれエンドリソソーム及びリソソームからの脱出も含む。細胞質ゾルに入った後、前記物質は、核などの他の細胞単位に移動する可能性がある。

【0155】

正式の用語において、グリコシドは、糖基がそのアノマー炭素を介してグリコシド結合により別の基に結合されている任意の分子である。本発明に関連してサポニンなどのグリコシド分子は、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、特に、エフェクター部分のエンドソーム脱出を促進することによってエフェクター部分の効果をさらに強化することができるような分子である。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、グリコシド分子（本明細書及び特許請求の範囲において例示されるものなどの本発明のサポニン）は、エンドサイトーシス経路及びリサイクリング経路の区画及び小胞の膜と相互作用し、それらを前記エフェクター部分が漏れるようにして、エンドソーム脱出の増強をもたらす。用語「足場がエフェクター部分のエンドソーム脱出を増強することができる」は、リンカーを介して若しくは直接的に s d A b などの細胞表面分子標的化抗体にカップリングされるか又は足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）のポリマー若しくはオリゴマー構造を介してカップリングされる少なくとも1つのサポニン（グリコシド分子）が、両方の分子がエンドソーム、例えば、後期エンドソーム内にあるとき、任意選択により及び好ましくは、少なくとも1つのサポニンが、例えば、少なくとも1つのグリコシド（サポニン）とコンジュゲート（例えば、足場のポリマー若しくはオリゴマー構造を介する及び／又はリンカーを介する）の間の切断可能な結合の切断によって前記コンジュゲートによって含まれるリンカー又はポリマー若しくはオリゴマー構造からなど、コンジュゲートから遊離された後にエフェクター部分のエンドソーム脱出を強化することができることを意味する。たとえ任意選択によりリンカー又は足場を介する本発明による少なくとも1つのサポニンと本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化 s d A b の間の結合が「安定な結合」であっても、そのような結合が、例えば、酵素によってエンドソームにおいて切断できないことを意味するわけではない。例えば、任意選択によりリンカー又は足場のオリゴマー若しくはポリマー構造の一部と合わせたサポニンは、残っているリンカー断片又はオリゴマー若しくはポリマー構造から切断され得る。例えば、プロテアーゼが、（タンパク質性）リンカー又はタンパク質性ポリマー構造、例えば、アルブミンを切断し、それによって少なくとも1つのサポニンを遊離する可能性もある。しかしながら、グリコシド分子（好ましくはサポニン）が活性形態、好ましくは、任意選択により、リンカー及び／又はオリゴマー若しくはポリマー足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）を介して本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化 s d A b にカップリング（されるように調製される）される前に有した本来の形態で遊離され、したがって、グリコシド（サポニン）がそのような切断後にその天然の構造を有するか又はグリコシド（サポニン）がそのような切断後に化学基又はそれに結合されるリンカー（の一部）を有する一方で、グリコシド生物活性（サポニン生物活性）、例えば、同じエンドソーム又はリソソーム中に存在するエフェクター部分に対するエンドソーム／リソソーム脱出強化活性が、任意選択により本発明のリンカー及び／又は足場を含むグリコシド（サポニン）と s d A b などの細胞表面分子標的化抗体の間の結合の前記切断時に維持されるか又は回復されることが好ましい。本発明に関して、例えば、コンジュゲート、リンカー、ポリマー又はオリゴマー構造（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲートとしても知られる足場の）、リガンド、（モノクローナル）免疫グロブリン若しくは結合ドメイン又はその断片、及び／又はエフェクター（エフェクター部分、エフェクター分子）におけるサポニンと細胞表面分子標的化 s d A b のアミノ酸残基の間の結合に関する用語「安定な」は、結合が容易に切断されないか又は少なくとも、例えば、pHの差、塩濃度、又はUV光、還元的条件によって容易に切断されるように設計されていない結合であることを意味する。本発明に関して、例えば、サポニンと細胞表面分子標的化 s d A b、リンカー、アミノ酸残基、共有結合性サポニンコンジュゲートのポリマー若しくはオリゴマー構造、リガン

10

20

30

40

50

ド、抗体及び／又はエフェクター分子の間の結合に関する用語「切断可能」は、結合が、例えば、pHの差、塩濃度、還元的条件下などによって容易に切断されるように設計されていることを意味する。当業者は、そのような切断可能な結合及びそれらを調製する方法をよく知っている。

【0156】

本発明より以前は、ADC及びAOCを市場に導入する主要なハードルの1つは、狭い治療域であった：治療有効量のADC又はAOCは、ADCによる患者の治療における開発及び意義を妨害する（許容されない）副作用を伴う。ADC－サポニンコンジュゲート及びAOC－サポニンコンジュゲートなどの本発明のコンジュゲートの適用によって、ペイロードを有するADCとともに又は本発明によるBNAなどのオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた（モノクローナル）抗体（sdAb）とともに、1つ又は複数のグリコシド分子（サポニン）を（標的）細胞に導くことが現在可能になった。特に、以前は、ADC若しくはAOC又はペイロードの任意の他のコンジュゲートのエフェクター部分及び（タンパク質性）細胞表面分子標的化分子、並びにエフェクター部分当たり（既定の、制御可能な）特定の数又は範囲のグリコシド分子（サポニン）を、細胞のエンドサイトーシス経路などを介して同時に細胞の細胞質ゾルに特異的に導くことが可能ではなかった。

【0157】

本発明によって提供される解決策は、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子、すなわち、sdAbへの少なくとも1つのサポニンの共有結合を含む。本発明によって提供されるさらなる解決策は、オリゴマー又はポリマー足場を使用してグリコシド分子（サポニン）を（最初に）重合すること、及び一群の共有結合されるサポニンを有する本発明のコンジュゲートによって含まれる細胞表面分子標的化分子をもたらして、例えば、エンドサイトーシスの後にサポニンの作用機序が望まれる細胞内部位での1つ以上のサポニンの再単量体化を可能にすることを含む。これに関連して「重合する」は、リンカーを介する、又は直接的な若しくはポリマー若しくはオリゴマー構造を介するsdAbへのサポニン分子の可逆的な及び／又は不可逆的な多重のコンジュゲーションにより足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）を形成すること又は（修飾された）サポニンの可逆的な及び／又は不可逆的な多重のコンジュゲーションによりポリマー又はオリゴマー構造を形成して、足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）を形成することを意味する。これに関連して「再単量体化」は、例えば、エンドサイトーシス後に、サポニンをコンジュゲートから、サポニンをコンジュゲートの細胞表面分子標的化sdAbに連結するリンカーから、又は足場から切断して、未結合サポニンの（天然の）化学的狀態を回復させることを意味し、未結合サポニンは、サポニンをリンカー、コンジュゲートのアミノ酸残基又は足場に連結するための化学基、及び／又はアルデヒド基又はカルボン酸基などのサポニンの化学基に結合された（化学的）リンカーなどの追加の化学基を含んでもよい、含まなくてもよい。サポニンの複雑な化学作用に起因して、例えば、足場又は他の連結リンカーでのサポニンの「重合」及び例えば、エンドサイトーシス後の細胞内などの所望の位置でのそれらの「再単量体化」は、難しい課題であった。特に、リンカー及びコンジュゲート、例えば、トリテルペノイドサポニン（グリコシドの重合）に共有結合するための共有結合的に連結されたグリコシドを含む足場を提供するために使用される化学反応は通常、水を含まない有機溶媒中で起こるが、サポニン及び例えば、結合サポニンを有するための足場として適用される生体適合性ポリマーは、水溶性の分子である。未修飾サポニンの化学的特性はさらにそれ自体での重合を禁止し、複数のサポニンを（直接的に）エフェクター分子に結合するための1つの他の可能な解決策は、あまり有望ではないと推定されたが、それは、エフェクター分子（薬物、毒素、ポリペプチド又はポリヌクレオチド）が通常、十分な結合部位を提供しないためであり、カップリング生成物が、非常に不均一になり及び／又はサポニンなどの生物活性分子及び例えば、ペプチド、毒素、核酸を合わせてカップリングすると、そのようなサポニンを含むコンジュゲートに合わせて結合された分子の一方又は両方の活性に影響を及ぼし及び妨害するリスクを有するためである。さらに、サポニンが、例えばADC又は抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート（

AOC)にカップリングされるとき、本発明のコンジュゲートによって含まれるエフェクター部位がその機能を失うリスクが大きかった。本発明の実施形態は、これらの欠陥の少なくとも1つを解決する。

【0158】

本発明の第2の態様は、本発明のコンジュゲート、及び任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0159】

1つ以上の(切断可能な)リンカー及び／又は任意選択により足場(本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート)をさらに含むか又は含まない、サポニンを含む本発明のコンジュゲートが、酸性環境を妨害し、少なくとも1つのグリコシド(サポニン)のエンドソーム脱出機能を阻害できるかどうかは、実施例の節に記載されるとおりのアッセイにより、当技術分野で知られるとおりに容易に決定され得る。阻害は、「50%の細胞の死滅の誘導に必要なグリコシド(本発明のサポニン)の量の増加倍率」として記載される。足場は、少なくとも、陽性対照としてクロロキンを使用するときに観察される50%の細胞の死滅を得るのに必要なグリコシド分子(サポニン)における増加量である増加量をもたらさないことが好ましい。或いは、及び好ましくは、1つ以上の(切断可能な)リンカー及び／又は任意選択により足場を含むか又はさらに含まない、サポニンを含むコンジュゲートは、50%の細胞の死滅を誘導するためにグリコシド分子の少なくとも4倍の増加をもたらさず、より好ましくは、少なくとも2倍の増加をもたらさない。増加倍率は、アッセイにおいて測定されることになり、陽性対照としてのクロロキンは、グリコシドの量、好ましくは、サポニンの量の2倍の増加を誘導し、サポニンは、50%の細胞の死滅を観察する本発明のサポニン(前の実施形態)のいずれか1つ以上である。

【0160】

前述のとおり、本発明によるコンジュゲートによって含まれる少なくとも1つのサポニンは、本発明で定義されるとおりの少なくとも既存の及び新規のエフェクター部分の有効性を増大させる。潜在的な副作用は、コンジュゲートによって含まれるエフェクター部分の投与が減少されるため、有効性の低下を伴わずに減少されることになる。したがって、本発明は、医療における使用のための又は医薬としての使用のための本発明によるコンジュゲートを提供する。本発明の第3の態様は、医薬としての使用のための本発明の医薬組成物に関する。

【0161】

いくつかの好ましい特徴が、本発明のコンジュゲートによって含まれるエンドソーム脱出エンハンサー、すなわち、本発明のサポニンのために配合され得る：(1)それらは、好ましくは、毒性ではなく、免疫応答を引き起こさない、(2)それらは、好ましくは、エフェクター部分のオフターゲット細胞への細胞質ゾル取り込みを媒介しない、(3)作用部位でのそれらの存在は、好ましくは、エフェクター部分の存在と同期する、(4)それらは、好ましくは、生物分解性であるか又は排出可能である、及び(5)それらは、好ましくは、エンドソーム脱出エンハンサーが合わせられるエフェクター分子の生物活性に関連しない生物体の生物プロセスに実質的に支障をきたさない、例えば、ホルモンと相互作用しない。少なくともある程度、前述の判定基準を満たす本発明のサポニンの例は、ビデスモサイドトリテルペンであり、好ましくは、ビデスモサイドトリテルペンサポニン、例えば、SO1861、SA1641、QS-21、GE1741、及び本明細書全体にわたって列挙されるさらなるサポニンである。

【0162】

また、医薬を製造するための本発明によるコンジュゲートの使用が提供される。特に、癌医薬、及び特に、従来の化学療法医薬は、それらの副作用で有名である。コンジュゲートによって含まれる薬学的に活性な物質及び全く同じコンジュゲート分子によって含まれるサポニンの両方の時機及び場所の標的化及び同期化のために、本発明による治療的コンジュゲートは、医薬としての使用、特に、癌を治療する方法における使用に特に有用である。したがって、本発明は、癌を治療する方法における使用のための本発明による治療的

コンジュゲートを提供する。本発明はまた、後天的又は遺伝性障害、特に、一遺伝子性欠損障害を治療する方法における使用のための本発明による治療的コンジュゲートを提供する。したがって、治療的コンジュゲートは、少なくとも1つのサポニン及び少なくとも1つのエフェクター部分、並びに腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの異常な標的細胞でコンジュゲートを標的化するためのs d A bを含む。したがって、本発明のある態様は、本発明による治療的コンジュゲートに関し、コンジュゲートは、癌又は自己免疫疾患の治療のための方法における使用のために、共有結合されたエフェクター部分を含み、及び共有結合されたサポニン、及びs d A bなどの細胞表面分子結合抗体を含む。

【0163】

医療における本発明のコンジュゲートのさらなる適用は、不十分な量又は不十分な機能性においてこれらの酵素を生成する標的細胞における細胞内酵素の置換である。結果として生じる疾患は、遺伝性又は後天的であり得る。多くの場合、対症療法のみが可能であり、いくつかの希少疾患に関して、不十分な治療選択肢は、当該患者の寿命の短縮につながる。そのような疾患に関する例は、フェニルケトン尿症であり、これは、アミノ酸フェニルアラニンの代謝の低下を引き起こす代謝の先天性異常である。その疾患は、肝臓酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼのための遺伝子における変異によって特徴付けられる。フェニルケトン尿症は、現在までに治療可能ではない。発生率は、およそ1：10,000であり、知られている最も高い発生率はトルコにおける1：2,600である。結合されたフェニルアラニンヒドロキシラーゼ又はフェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードする結合されたポリヌクレオチドを伴う本発明のコンジュゲートによって含まれる細胞表面分子標的化抗体、好ましくは、V_HHなどのs d A bを使用して、好適な特異的抗体又はs d A bの使用によって肝臓細胞を標的化し、肝細胞における欠損酵素を置換することができる。これは、置換又は遺伝子治療のための、本発明による結合されたサポニン及び結合された酵素又はオリゴヌクレオチドを含む本発明の治療的コンジュゲートの使用の一例である。好ましい実施形態では、遺伝子治療又は置換療法の方法における使用のための本発明による治療的コンジュゲートが提供される。

【0164】

本発明のコンジュゲートにより、一成分の非ウイルス性の臨床的に適用可能な遺伝子送達技術を設計し、製造することが現在可能になった。例えば、本発明のコンジュゲートは、より低い治療用量による治療有効性を高め、それにより患者の健康を改善する非ウイルス系遺伝子送達技術の開発を可能にする。本発明のコンジュゲートは、特に、（腫瘍、自己免疫）細胞表面特異的分子に結合するためのモノクローナル抗体又はs d A bなどの共有結合された細胞表面分子標的化抗体を含むとき、及びオリゴヌクレオチド、例えば、BNAなどのエフェクター部分に結合されるとき、遺伝子送達の分野における長期にわたる主要なボトルネックを克服すること、すなわち、効率的であり、安全であり及び対費用効果の高い遺伝子治療製品のエンドソーム膜を通過する細胞質ゾル／ヌクレオゾルへの移行を可能にする。実際に、遺伝子治療は、広範な疾患における将来の先進的な療法のための最も有望な治療選択肢の1つである。遺伝子送達の成功には、標的細胞の認識並びに遺伝子の細胞質ゾル及びヌクレオゾル取り込みが必要となる。非ウイルス性遺伝子治療の分野における主要な問題の1つは、患者における治療的使用のための遺伝子材料の非効率的であり及び安全性が不十分な送達である。

【0165】

したがって、リガンド又は好ましくは、抗体（その断片、ドメイン、好ましくはs d A b）などの細胞標的化細胞表面分子標的化分子を含み及びアンチセンスBNAなどのオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートを適用するとき、本発明者らは現在、遺伝子送達の分野における長期にわたる主要なボトルネック：遺伝子治療製品のエンドソーム膜を通過する細胞質ゾル／ヌクレオゾルへの安全な移行を克服することを可能にした。本発明のコンジュゲートは、全ての既知の遺伝因子による任意のアドレス指定できる細胞型の標的化を可能にし、それにより遺伝性障害に限定されないが、癌療法についても良好な患者療法を確実にするために設計された技術となり、したがって、大きい患者群にとって

重要である。本発明のコンジュゲートに基づく技術は、本明細書で例示されるとおりのサポニン、及び本発明による実施形態のサポニンなどのエンドソーム脱出エンハンサー（E E E）のため、標的化リガンド若しくは（モノクローナル）（腫瘍細胞特異的）抗体、又はその断片、又は好ましくはV_HHなどのs d A bなどの細胞表面分子標的化分子、及びエフェクター部分、本明細書のL N A又はB N Aなどのエフェクター遺伝子のための担体として機能するポリマー又はオリゴマー足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）を含み得る。例えば、細胞標的化抗体（断片）又はs d A b及びB N Aなどのオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートの使用は、あらゆる種類の生体高分子を細胞質ゾル及び核に運ぶ潜在力を有する。新規の標的化リガンド、s d A b及びモノクローナル（ヒト、ヒト化）抗体の開発は、世界中の多数の研究グループ及び会社によって継続的に検討されている。癌細胞などの疾患細胞の細胞質ゾルにおける送達を目的としたオリゴヌクレオチドについても同じである。したがって、本発明のコンジュゲートは、現在及び将来の標的化s d A b及び抗体並びに現在及び将来の治療用オリゴヌクレオチド（並びにタンパク質毒素などのペイロード）が、例えば、本発明のオリゴマー又はポリマー足場モジュール（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）にクリックケミストリーによって連結されるか又は連結され得る分子インターフェースとしてもふるまい、個別化された薬物適用並びに組織及び細胞標的化技術の分野における将来の発展を可能にしている。本発明のコンジュゲートは、細胞表面分子標的化分子としての抗体及びリガンドを含み得るが、s d A bが好ましい。遺伝子治療薬の世界市場は急速に成長しており、癌、心血管疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、H I V及び多くの希少（単性の）疾患などの広範な疾患領域のための可能な治療を包含している。既存のウイルス性ベクターに基づく遺伝子治療薬技術は、安全性、製造ロジスティクス、及びそれに伴う高コストなどの重要な課題を有する。本発明のコンジュゲートは、既存のウイルス性遺伝子送達技術のための代替物となる技術プラットフォームにおける使用を可能にする。したがって、本発明のコンジュゲートは、癌、心血管疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、H I V感染及び多くの希少（単性の）疾患などの疾患のための非ウイルス性遺伝子治療を開発するためのアプローチにおける実践に好適である。本発明のコンジュゲートは、標的化アンチセンスB N Aに基づくものなどの非ウイルス性ベクターに基づく遺伝子治療薬を作製することによって抗体-薬物コンジュゲート（A D C）及びオリゴヌクレオチドに基づく治療薬の分野を一変させるための新規の治療を開発するのに好適である。特に、s d A bなどの抗体及びB N Aなどのオリゴヌクレオチド及び少なくとも1つのサポニンを有する共有結合性コンジュゲートにおける本発明のコンジュゲートの適用は、本発明に起因して可能になった多くの有利なアプローチの1つである。例えば、本発明のコンジュゲートの使用は現在、哺乳動物細胞のエンドサイトーシス経路の活用を可能にする。エンドサイトーシスは、治療薬の送達のために活用され、本発明のコンジュゲートは、例えば、コンジュゲートによって含まれるs i R N Aの取り込み及びエンドソーム脱出の改善に寄与する。本発明のコンジュゲートは、例えば、ペイロード、オリゴヌクレオチドのための送達エンハンサーとして作用する小分子とともに使用されるのが好適である。これに加えて、B N Aなどの共有結合的にカップリングされたオリゴヌクレオチドを有し、リガンド及び好ましくは抗体（ドメイン又は断片、好ましくはV_HH）などの共有結合的にカップリングされた細胞標的化部分を有し、本発明のサポニンを有する本発明のコンジュゲートは、二構成成分としてのそれらの適用に関連し、それにより治療上の承認及び臨床適用性を複雑にしている既存のエンドソーム脱出エンハンサー及び遺伝子治療製品に見られる既存の問題に対する解決策を提供し、それは、本発明のそのようなコンジュゲートが、サポニン、B N Aなどの遺伝子産物及び（モノクローナル）抗体又はs d A bなどの（腫瘍）細胞標的化部分を包含する単一コンジュゲート治療分子であるためである。したがって、本発明は、非ウイルス性遺伝子送達技術を提供し、エンドソーム脱出エンハンサー（例えば、本発明の実施形態及び提供される例のグリコシド）、遺伝子治療製品（B N Aなどの本発明によるオリゴヌクレオチド）及び標的化リガンド又は抗体（例えば、本発明の実施形態によるもの及び実施例の節において本明細書の下で例示されるs d A b）は全て、本発明のコンジュゲ

10

20

30

40

50

トによって含まれる。したがって、そのような本発明のコンジュゲートは、広範な疾患及び大きい患者群に対して既存の及び将来の高分子薬物のための治療機会を提供する。少なくとも1つのサポニン、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド及び免疫グロブリン又はs d A bなどの少なくとも1つの特異的な細胞標的化部分を含むそのような本発明のコンジュゲートの適用により、エンドソーム脱出エンハンサー及び遺伝子治療製品を別々に適用する既存の方法（既存の方法は、両方の化合物が相互作用部位で同時に存在することを保証しない）に関して明らかな問題が対処される。この問題は現在、本発明のコンジュゲートを使用することによって克服される。すなわち、そのような本発明のコンジュゲートは、両方の化合物、すなわち、サポニン及びB N Aなどの遺伝子産物の同期化（時機及び場所）の増大を有する非ウイルス性遺伝子送達技術を提供する。

10

【0166】

遺伝子治療は、嚢胞性線維症、コレラ、ハンチントン病又は血友病などの遺伝性の以前は治療可能ではなかった疾患に役立つ可能性がある。しかしながら、現在のいくつかの問題は克服されていない：例えば、治療用遺伝子は、身体の特定の標的細胞に正確に到達しなければならない。他方で、治療用遺伝子は、標的化される細胞によって吸収されるべきであるが、治療用遺伝子は破壊されてはならない。既存の遺伝子治療アプローチは、遺伝子のための連絡船としてウイルスを使用する。しかしながら、これらの手順は、多大なリスクを含み、他の生体分子の導入に転用することができない。ある実施形態は、担体分子としてのコンジュゲートによって含まれるときに遺伝子の送達を可能にするだけでなく、標的細胞に導入されることになる異なる治療用生体分子の送達も可能にするプラットフォーム技術の使用のための（植物由来）グリコシド（例えば、本発明のサポニンのいずれか1つ）を含む本発明のコンジュゲートである。したがって、本発明のコンジュゲートは、嚢胞性線維症、コレラ、ハンチントン病又は血友病のための核酸に基づく治療を開発するために使用される。これに加えて、本発明のコンジュゲートにより、新規の遺伝子治療戦略は、嚢胞性線維症、ハンチントン病、及び血友病を有するそれらの患者を含む遺伝性疾患を有する患者の健康を改善するために利用可能である。本発明の一部として、全てが単一のコンジュゲートにおいて含まれる植物由来エンドソーム脱出エンハンサー（グリコシド；すなわち、本発明のサポニン）、遺伝子治療製品、及び標的化リガンド（すなわち、s d A b）を組み合わせた非ウイルス性遺伝子送達技術が開発される。本発明のコンジュゲートに基づく結果として生じる非ウイルス性遺伝子治療は、現在利用可能な戦略より低い投与量で約40倍の送達効率の増大を示す。これに加えて、本発明のコンジュゲートは、嚢胞性線維症患者におけるような欠陥のある遺伝子の修復又は置き換えのため、及び例えば、癌細胞を破壊するための特定の遺伝子の標的化された送達のためなどの臨床適用における使用のためのものである。実際に、本発明のコンジュゲートは、嚢胞性線維症、ハンチントン病及び血友病などの現在治療可能ではない遺伝子の欠陥によって引き起こされるいずれかの疾患のための治療レジメンにおける適用に好適である。本発明のコンジュゲートを利用する遺伝子治療は、2つの既存の問題を克服する際に有用である：第一に、本発明のコンジュゲートにより、身体の特定の標的細胞に治療用遺伝子を送達することが可能であり；第二に、治療用遺伝子は、例えば、本発明のオリゴマー又はポリマー足場（本発明の共有結合性サポニンコンジュゲート）を使用することによって全てが本発明の

20

30

40

【0167】

本発明はまた、癌を治療する方法であって、本発明による治療用コンジュゲートを含む医薬を、それを必要とする患者に投与すること、好ましくは、有効用量の前記医薬を、それを必要とする患者、好ましくは、ヒト癌患者に投与することを含む方法を提供する。

【0168】

投与に好適な形態に関する考慮事項は当技術分野で知られており、毒性作用、溶解性、投与経路、及び活性の維持を含む。例えば、血流に注射される薬理学的組成物は可溶性で

50

ある必要がある。

【0169】

好適な剤形は、用途又は進入経路、例えば、経皮的又は注射によるものに部分的に依存する。そのような剤形は、標的細胞が多細胞性宿主に存在するか否かにかかわらず、化合物を標的細胞に到達させなければならない。他の要因は、当技術分野で知られており、毒性などの考慮事項及び化合物又は組成物にその作用の発揮を遅らせる剤形を含む。

【0170】

本発明の第4の態様は、以下のいずれか1つ以上の治療又は発症予防における使用のための本発明の医薬組成物に関する：癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、酵素欠損症、酵素欠損症に関連する疾患、遺伝子欠損、遺伝子欠損に関連する疾患、ウイルス感染などの感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、アルファ-1アンチトリプシン関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、アミロイドーシス及びトランスサイレチン媒介性アミロイドーシス。

【0171】

驚くべきことに、本発明者らは、いずれの腫瘍細胞の死滅ももたらさないADCのある用量が、そのようなADCが腫瘍細胞標的化抗体又はV_{HH}にカップリングされるサポニンの存在下で腫瘍細胞と接触されるときに効率的な腫瘍細胞の死滅に足りており及び十分であることを見出した。例は、図2～7において提供される。例えば、ある用量のADC抗CD71 V_{HH}-毒素、抗HER2 V_{HH}-毒素又は抗EGFR V_{HH}-毒素などのADCは、腫瘍細胞と接触されるときに腫瘍細胞に対する毒性作用を発揮しない。典型的な毒素は、タンパク質毒素、例えば、ジアンチン及びサポリンである。しかしながら、そのようなADCがサポニンを含むコンジュゲートとともに同時投与されるとき、効率的な腫瘍細胞の死滅が達成される。サポニンを含むコンジュゲートは、例えば、抗HER2 V_{HH}-SO1861、抗CD71 V_{HH}-SO1861、抗EGFR V_{HH}-SO1861、セツキシマブ-SO1861、トラスツズマブ-SO1861である。ADCは、例えば、HER2、CD71又はEGFRに結合することができるV_{HH}を含むADCであり、例えば、ADCは、ジアンチン又はサポリンなどのタンパク質毒素を含む。サポニン及び腫瘍細胞標的化抗体又はV_{HH}を含むコンジュゲートを適用することによって、標的細胞内部でのADC、すなわち、ADC又はAOCによって含まれるエフェクター分子の効率的な生物活性を達成するのに必要なサポニン用量は、サポニンを含むコンジュゲートが、標的細胞にADC、すなわち、ADC又はAOCで同時投与されるとき、ADCが遊離サポニンとともに標的細胞に同時投与されるときに必要な遊離サポニンの用量と比較して、約100～1000倍低い。これに加えて、サポニンを含むコンジュゲートは、ADC、すなわち、ADC又はAOCを含むsdAbを、標的化サポニンの非存在下でそれを必要とする患者に投与されたとき、そうでなければ腫瘍細胞に効果がないであろうADC又はAOCの用量で増強し、これに加えて、サポニンを含むコンジュゲートは既に、ADC又はAOCのエフェクター分子の増強が考慮されるとき、相対的に低い用量、すなわち、sdAbなどの腫瘍細胞標的化結合分子とともに提供されない遊離サポニンがエフェクター分子の増強に十分には効果的ではない用量で既に十分に効果的である。組み合わせ、本発明者らは、ADC又はAOCが既に、腫瘍細胞標的化抗体又はV_{HH}を含み及びサポニンを含むコンジュゲートの存在下で患者に同時投与されるときにより低い用量で効果的であるため、治療有効量の腫瘍細胞標的化sdAbを含むADC又はAOCによる治療を必要とするヒト患者を治療するための改善された方法を提供した。この組み合わせの多くの利点の1つは、ADC、また好ましくはサポニンを含むコンジュゲートにおけるsdAb部分においてFcテイルが存在しないことにある。Fcテイルの欠如は、そうでなければ結合が多くの従来のADC、AOCに関して見られるものなどのそのようなFcテイルが存在する場合に副作用をもたらす可能性がある、コンジュゲートのFc受容体を有するオフターゲット患者細胞への望まれない結合を妨げる。Fcテイルを含む抗体に基づくADC及びAOCは、そのようなIgGに基づくADC、AOCのFc受容体への望まれない結合のために有効性の低下を欠点として持つ。Fc受容体結合の結果として

10

20

30

40

50

、そのようなIgGに基づくADC及びAOCの有効量が減少される。それに加えて、Fcテイルの欠如は、これに関していくつかの利点を提供する。Fc受容体に対するADC、AOC並びに本発明の改良型ADC及び改良型AOC（すなわち、本発明のコンジュゲート）のオフターゲット及び望まれない結合は起こり得ない。これに加えて、本発明のADC、AOC及びコンジュゲートは、IgGに基づくコンジュゲートで見られる欠陥であるFc受容体結合に起因してコンジュゲートが「失われ」ないため、標的受容体媒介性エンドサイトーシス及びエンドソーム内部への本発明のADC、AOC及びコンジュゲートの送達が考慮されるときにより低い有効用量を有する。結果として、全てがFcを含む抗体の代わりに細胞標的化sdAbを含む本発明のADC、AOC及びコンジュゲートの治療域は、sdAbがFcテイルを含む従来のIgGによって置き換えられるときに達成されたであろう治療域より広い。同様に、結果として、サポニンを含むコンジュゲートの治療域は、腫瘍細胞標的化sdAb及びサポニンのそのようなコンジュゲートにおけるsdAbが、Fcテイルを含む従来のIgGなどの標的細胞上の細胞表面分子に結合するための結合分子によって置き換えられるときに達成されたであろう治療域より広い。

【0172】

ある実施形態は、サポニンが、SO1861、SO1861誘導体、QS-21、又はQS-21誘導体、好ましくはSO1861誘導体又はQS-21誘導体、より好ましくは本発明によるSO1861誘導体である本発明の使用のための医薬組成物である。

【0173】

ある実施形態は、本発明の使用のための医薬組成物であり、

- － 前記使用は、ヒト対象における癌の治療又は予防におけるものであり；及び／又は
- － 前記使用は、必要とする患者における癌の治療若しくは発症予防におけるものであり、少なくとも1つのsdAbが、細胞の細胞表面分子、好ましくは、細胞の腫瘍細胞表面分子、より好ましくは、細胞の腫瘍細胞特異的表面分子に結合し；及び／又は
- － 医薬組成物、好ましくは、治療有効量の医薬組成物は、必要とする患者、好ましくは、ヒト患者に投与される。

【0174】

本発明の第5の態様は、本発明のエフェクター分子を細胞の外部から前記細胞の内部に、好ましくは、前記細胞の細胞質ゾルに移行させるためのインビトロ又はエキスピボでの方法であって、

a) その細胞表面上で、本発明のコンジュゲートによって含まれる少なくとも1つのsdAbのための結合部位であって、前記結合部位が、好ましくは、細胞の細胞表面分子上に存在し、前記細胞が、好ましくは、肝臓細胞、ウイルス感染細胞などの異常な細胞、自己免疫細胞、遺伝子欠損を含む細胞、酵素欠損を含む細胞及び腫瘍細胞から選択される結合部位を発現する細胞を提供する工程；

b) 本発明のコンジュゲートであって、工程a)において提供される細胞に移行されることになるエフェクター分子を含む前記コンジュゲートを提供する工程；及び

c) 工程a)の細胞をインビトロ又はエキスピボで工程b)のコンジュゲートと接触させる工程

を含み、
それにより、エフェクター分子を含む前記コンジュゲートを、細胞の外部から前記細胞の内部に移行させる工程、及び前記コンジュゲートの移行により、エフェクター分子を細胞の外部から前記細胞の内部、好ましくは、前記細胞の細胞質ゾルに移行させる工程を含む、方法に関する。

【0175】

本発明の第6の態様は、本発明のコンジュゲートを細胞の外部から前記細胞の内部に移行させるためのインビトロ又はエキスピボでの方法であって、

a) その細胞表面上で、本発明のコンジュゲートによって含まれる少なくとも1つのsdAbのための結合部位であって、前記結合部位が、好ましくは、細胞の細胞表面分子上に存在し、前記細胞が、好ましくは、肝臓細胞、ウイルス感染細胞などの異常な細胞、自

10

20

30

40

50

己免疫細胞、遺伝子欠損を含む細胞、酵素欠損を含む細胞及び腫瘍細胞から選択される結合部位を発現する細胞を提供する工程；

b) 本発明のコンジュゲートを提供する工程；及び

c) 工程 a) の細胞をインビトロ又はエキスビボで工程 b) のコンジュゲートと接触させる工程を含み、それにより、コンジュゲートを細胞の外部から前記細胞の内部に移行させる工程を含む方法に関する。

【0176】

【表1】

表 A1. (後期)エンドソーム/リソソーム脱出増強活性を示すサポニン、及び(後期)エンドソーム/リソソーム脱出増強活性を示すそのようなサポニンに類似する構造を含むサポニン			
サポニン名称	アグリコンコア	C-3 ベータ-OH 基での炭水化物置換基	C-28-OH 基での炭水化物置換基
NP-005236	2 アルファ-ヒドロキシオレアノール酸	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16 アルファ-ヒドロキシオレアノール酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
AMR	16 アルファ-ヒドロキシオレアノール酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
アルファ-ヘデリン	ヘデラゲニン (23-ヒドロキシオレアノール酸)	Rha-(1→2)-Ara-	-
NP-012672	16 アルファ,23-ジヒドロキシオレアノール酸	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-	Ara/Xyl-
NP-017777	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4E-メトキシケイ皮酸)
NP-017778	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4Z-メトキシケイ皮酸)
NP-017774	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110 ^c , NP-017772 ^d	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-
NP-018109	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R = 4E-メトキシケイ皮酸)
NP-017888	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-017889	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641 ^a , AE X55 ^b	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
NP-017674	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017810	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
AG1	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-003881	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-

【0177】

10

20

30

40

50

【表 2】

NP-017676	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
NP-017677	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
NP-017706	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017705	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017773	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
NP-017775	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1861	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-di-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1542	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1584	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1658	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1674	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1832	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
QS-7 (QS1861 とも称される)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
QS-7 api (QS1862 とも称される)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
QS-17	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 3】

QS-18	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 A-apio	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 A-xylo	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 B-apio	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 B-xylo	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
ベータ-エスシン (記載: エスシン 1a)	プロトエシゲニン- 21(2-メチルブタ-2- エノエート)-22- アセテート	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	-
ティーシード サポニン I	23-オキソ-パリン トゲノール C -21,22- ビス(2-メチルブタ-2- エノエート)	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
ティーシード サポニン J	23-オキソ-パリン トゲノール C -21,22- ビス(2-メチルブタ-2- エノエート)	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
アッサムサポニン F	23-オキソ-パリン トゲノール C -21-(2- メチルブタ-2- エノエート)-16.22- ジアセテート	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
ジギトニン	ジギトゲニン	Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-	-
サクラソウ酸 1	3,16,28-トリヒドロキシ オレアナン-12-エン	Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	-
AS64R	ギブソゲン酸	-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-

【 0 1 7 9 】

【表 4】

		C-23-OH 基での 炭水化物置換基	
AS6.2	ギブソゲン酸	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
a, b: 異なる名称は、同じ構造の異なる単離物を指す			
c, d: 異なる名称は、同じ構造の異なる単離物を指す			

【0180】

本発明の態様は、本発明によるエンドソーム脱出強化コンジュゲートを含有する容器を含むキットであって、コンジュゲートを使用するための指示書をさらに含むキットに関する。

【0181】

本発明のある態様は、本発明の細胞表面分子標的化分子（すなわち、*s d A b*）を含み、及び *A D C* 又は *A O C* をもたらす本発明の少なくとも1つのエフェクター部分を含むか又は少なくとも1つの本発明のサポニンを含む、少なくとも1つの共有結合的に連結されたサポニンとともに提供される以下の *A D C* 及び少なくとも1つの共有結合的に連結されたサポニンとともに提供される以下の *A O C*、並びにそれらの半完成状態のコンジュゲートのいずれかに関し、以下の抗体は、*s d A b* である：

抗 *E G F R* 抗体－サポニン；

抗 *E G F R* 抗体－*C*－23位においてアルデヒド官能基を有する12，13－デヒドロオレアナンの型に属し、任意選択によりサポニンの *C*－3 ベータ－*O H* 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；

抗 *E G F R* 抗体－*S O 1 8 6 1*；

抗 *E G F R* 抗体－*G E 1 7 4 1*；

抗 *E G F R* 抗体－*S A 1 6 4 1*；

抗 *E G F R* 抗体－*Q u i l － A*；

抗 *E G F R* 抗体－*Q S － 2 1*；

抗 *E G F R* 抗体－キラヤ・サポナリア (*Q u i l l a j a s a p o n a r i a*) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；

セツキシマブに由来する *s d A b*－サポニン；

セツキシマブに由来する *s d A b*－*C*－23位においてアルデヒド官能基を有する12，13－デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンの *C*－3 ベータ－*O H* 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*S O 1 8 6 1*；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*G E 1 7 4 1*；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*S A 1 6 4 1*；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*Q u i l － A*；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*Q S － 2 1*；

セツキシマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－キラヤ・サポナリア (*Q u i l l a j a s a p o n a r i a*) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；

抗 *H E R 2* 抗体－サポニン；

抗 *H E R 2* 抗体－*C*－23位においてアルデヒド官能基を有する12，13－デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンの *C*－3 ベータ－*O H* 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；

抗 *H E R 2* 抗体－*S O 1 8 6 1*；

抗 *H E R 2* 抗体－*G E 1 7 4 1*；

抗 *H E R 2* 抗体－*S A 1 6 4 1*；

抗 *H E R 2* 抗体－*Q u i l － A*；

抗 *H E R 2* 抗体－*Q S － 2 1*；

抗 *H E R 2* 抗体－キラヤ・サポナリア (*Q u i l l a j a s a p o n a r i a*) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；

トラスツズマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－サポニン；

トラスツズマブの *V_H* 又は *V_L* に由来する *s d A b*－*C*－23位においてアルデヒド官能基を有する12，13－デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンの *C*

10

20

30

40

50

- 3 ベータ-OH 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - S O 1 8 6 1 ；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - G E 1 7 4 1 ；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - S A 1 6 4 1 ；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - Q u i l - A ；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - Q S - 2 1 ；
 トラスツズマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - キラヤ・サポナリア (Q u i l l a j a s a p o n a r i a) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；
 抗 C D 7 1 抗体-サポニン；
 抗 C D 7 1 抗体-C - 2 3 位においてアルデヒド官能基を有する 1 2 , 1 3 - デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンの C - 3 ベータ-OH 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；
 抗 C D 7 1 抗体-S O 1 8 6 1 ；
 抗 C D 7 1 抗体-G E 1 7 4 1 ；
 抗 C D 7 1 抗体-S A 1 6 4 1 ；
 抗 C D 7 1 抗体-Q u i l - A ；
 抗 C D 7 1 抗体-Q S - 2 1 ；
 抗 C D 7 1 抗体-キラヤ・サポナリア (Q u i l l a j a s a p o n a r i a) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - サポニン；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - C - 2 3 位においてアルデヒド官能基を有する 1 2 , 1 3 - デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンの C - 3 ベータ-OH 基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - S O 1 8 6 1 ；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - G E 1 7 4 1 ；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - S A 1 6 4 1 ；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - Q u i l - A ；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - Q S - 2 1 ；
 O K T - 9 の V_H又はV_Lに由来する s d A b - キラヤ・サポナリア (Q u i l l a j a s a p o n a r i a) の水溶性サポニン画分におけるサポニン；
 抗 E G F R 抗体-オリゴヌクレオチド；
 抗 E G F R 抗体-アンチセンスオリゴヌクレオチド；
 抗 E G F R 抗体-s i R N A ；
 抗 E G F R 抗体-アンチセンス B N A ；
 抗 E G F R 抗体-アンチセンス B N A (H S P 2 7) ；
 抗 E G F R 抗体-タンパク質性毒素；
 抗 E G F R 抗体-リボソーム不活性化タンパク質；
 抗 E G F R 抗体-ジアンチン；
 抗 E G F R 抗体-サポリン；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - オリゴヌクレオチド；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - アンチセンスオリゴヌクレオチド；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - s i R N A ；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - アンチセンス B N A ；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - アンチセンス B N A (H S P 2 7) ；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - タンパク質性毒素；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - リボソーム不活性化タンパク質；
 セツキシマブのV_H又はV_Lに由来する s d A b - ジアンチン；

10

20

30

40

50

セツキシマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －サポリン；

抗HER2抗体－オリゴヌクレオチド；

抗HER2抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド；

抗HER2抗体－ $s i R N A$ ；

抗HER2抗体－アンチセンスBNA；

抗HER2抗体－アンチセンスBNA（HSP27）；

抗HER2抗体－タンパク質性毒素；

抗HER2抗体－リボソーム不活性化タンパク質；

抗HER2抗体－ジアンチン；

抗HER2抗体－サポリン；

10

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －オリゴヌクレオチド；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスオリゴヌクレオチド；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ － $s i R N A$ ；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスBNA；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスBNA（HSP27）；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －タンパク質性毒素；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －リボソーム不活性化タンパク質；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －ジアンチン；

トラスツズマブの V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －サポリン；

抗CD71抗体－オリゴヌクレオチド；

20

抗CD71抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド；

抗CD71抗体－ $s i R N A$ ；

抗CD71抗体－アンチセンスBNA；

抗CD71抗体－アンチセンスBNA（HSP27）；

抗CD71抗体－タンパク質性毒素；

抗CD71抗体－リボソーム不活性化タンパク質；

抗CD71抗体－ジアンチン；

抗CD71抗体－サポリン；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －オリゴヌクレオチド；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスオリゴヌクレオチド；

30

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ － $s i R N A$ ；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスBNA；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －アンチセンスBNA（HSP27）；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －タンパク質性毒素；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －リボソーム不活性化タンパク質；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －ジアンチン；

OKT-9の V_H 又は V_L に由来する $s d A b$ －サポリン；

抗EGFR抗体（－オリゴヌクレオチド）（－サポニン）（オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、 $s i R N A$ 、アンチセンスBNA、及びアンチセンスBNA（HSP27）のいずれか1つ以上であり、並びにサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベータ-OH基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はピデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quill-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア（*Quillaja saponaria*）の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗EGFR抗体は、好ましくは、セツキシマブである）；

40

抗EGFR抗体（－タンパク質性毒素）（－サポニン）（タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン及びサポリンのいずれか1つ以上であり、並びにサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベータ-OH基での炭水化物置換基にお

50

いてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗EGFR抗体は、好ましくは、セツキシマブである) ;

抗HER2抗体 (ーオリゴヌクレオチド) (ーサポニン) (オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アンチセンスBNA、及びアンチセンスBNA (HSP27) のいずれか1つ以上であり、並びにサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベーターOH基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はバイデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗HER2抗体は、好ましくは、トラスツズマブである) ; 抗HER2抗体 (ータンパク質性毒素) (ーサポニン) (タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン及びサポリンのいずれか1つ以上であり、且つサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベーターOH基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はバイデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗HER2抗体は、好ましくは、トラスツズマブである) ;

抗CD71抗体 (ーオリゴヌクレオチド) (ーサポニン) (オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アンチセンスBNA、及びアンチセンスBNA (HSP27) のいずれか1つ以上であり、並びにサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベーターOH基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はバイデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗CD71抗体は、好ましくは、OKT-9である) ; 並びに抗CD71抗体 (ータンパク質性毒素) (ーサポニン) (タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン及びサポリンのいずれか1つ以上であり、並びにサポニンは、C-23位においてアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC-3ベーターOH基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はバイデスモサイドトリテルペンサポニン、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21、並びにキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれか1つ以上であり、抗CD71抗体は、好ましくは、OKT-9である) 。

【0182】

ある実施形態は、細胞表面分子標的化分子が、セツキシマブ、トラスツズマブ、OKT-9のV_H又はV_Lに由来するsdAb (すなわち、sdAbは、そのようなモノクローナル抗体のV_H又はV_Lに基づき、及び標的細胞の細胞表面上の標的受容体に特異的に結合することができる) から選択され、及び／又はエフェクター部分が、ジアンチン、サポリン及びアンチセンスBNA (HSP27) から選択され、及び／又はサポニンが、SO1861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21及びキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の水溶性サポニン画分におけるサポニン又はその誘導体から選択される本発明の半完成状態のコンジュゲート (sdAb-サポニ

10

20

30

40

50

ン又はs d A b－エフェクター部分）又は本発明のコンジュゲートである。

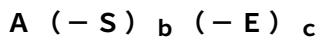
【0183】

ある実施形態は、細胞表面分子標的化分子が、セツキシマブ、トラスツズマブ、O K T－9のV_H又はV_Lに由来するs d A b（すなわち、s d A bは、そのようなモノクローナル抗体のV_H又はV_Lに基づき、及び標的細胞の細胞表面上の標的受容体に特異的に結合することができる）から選択され、及び／又はエフェクター部分が、ジアンチン、サポリン及びアンチセンスBNA（H S P 2 7）から選択され及び／又はサポニンが、S O 1 8 6 1、G E 1 7 4 1、S A 1 6 4 1、Q u i l l－A、Q S－2 1及びキラヤ・サポナリア（Q u i l l a j a s a p o n a r i a）の水溶性サポニン画分におけるサポニン又はその誘導体から選択される本発明によるコンジュゲートである。

10

【0184】

本発明のある態様は、本発明の細胞表面分子標的化分子s d A bを含み及び本発明の少なくとも1つのエフェクター部分を含み及び／又は本発明の少なくとも1つのサポニンを含む、構造CのA D C若しくはA O C、又は半完成状態のA D Cコンジュゲート若しくは半完成状態のA O Cコンジュゲート：



（構造C）

（式中、Aは、細胞表面分子標的化s d A bであり；

Sは、サポニンであり；

Eは、エフェクター部分であり；

b = 0～64、好ましくは、0、1、2、3、4、8、16、32、64又はその間にある任意の整数若しくは小数部であり；

c = 0～8、好ましくは、0、1、2、3、4、6、8又はその間にある任意の整数若しくは小数部であり；

Sは、A及び／又はEにカップリングされ、Eは、A及び／又はSにカップリングされ、好ましくは、Sは、Aにカップリングされ、Eは、Aにカップリングされる）に関する。

20

【0185】

ある実施形態は、Aが、セツキシマブなどの抗E G F R抗体、トラスツズマブなどの抗H E R 2抗体、O K T－9などの抗C D 7 1抗体に由来するs d A bであり、及び／又はSが、サポニン、C－23位においてアルデヒド官能基を有する12，13－デヒドロオレアナンの型に属し及び任意選択によりサポニンのC－3ペーターO H基での炭水化物置換基においてグルクロン酸官能基を含むトリテルペノイドサポニン及び／又はビデスモサイドトリテルペンサポニン、S O 1 8 6 1、G E 1 7 4 1、S A 1 6 4 1、Q u i l l－A、Q S－2 1、並びにキラヤ・サポナリア（Q u i l l a j a s a p o n a r i a）の水溶性サポニン画分におけるサポニンのいずれかのいずれか1つ以上であり、及び／又はEが、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、アンチセンスBNA、及びアンチセンスBNA（H S P 2 7）のいずれか1つ以上、並びに／又はタンパク質性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン及びサポリンのいずれか1つ以上である本発明の構造Cである。

30

【0186】

ある実施形態は、サポニン（存在する場合）、及び／又はエフェクター部分（存在する場合）が、切断可能なリンカーなどの少なくとも1つのリンカーを介して並びに／又はN－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（E M C H）、3－（2－ピリジルジチオ）プロパン酸サクシニミジル又は3－（2－ピリジルジチオ）プロパン酸N－ヒドロキシサクシニミドエステル（S P D P）、及び1－[ビス（ジメチルアミノ）メチレン]－1 H－1，2，3－トリアゾロ[4，5－b]ピリジニウム3－オキシドヘキサフルオロホスフェート（H A T U）に基づくリンカーなど及びG 4－デンドロンなどのデンドロン又は構造Aの三官能性リンカーなどの三官能性リンカーに基づく共有結合性サポニンコンジュゲート（足場）などの共有結合性サポニンコンジュゲート（すなわち、少なくとも1つのオリゴマー又はポリマー足場）を介して共有結合的にカップリングされ、及び／又は細胞表面

40

50

分子標的化抗体、好ましくは、本発明による V_{HH} などの $s d A b$ の少なくともリジン側鎖及び／又はシステイン側鎖が、サポニン及び／又はエフェクター部分及び／又はリンカー及び／又は切断可能なリンカー及び／又は共有結合性サポニンコンジュゲートとの共有結合に参与し、好ましくは、サポニン及び／又はエフェクター部分が、細胞表面分子標的化分子、好ましくは、 $s d A b$ などの抗体に共有結合的に連結され、共有結合的連結が、アミド結合、ヒドラゾン結合、ジスルフィド結合を含むか又はそれらからなる本発明の構造C、本発明のコンジュゲート又は本発明の半完成状態のコンジュゲートである。

【0187】

本発明のある態様は、医薬としての前述のコンジュゲート、共有結合的に連結されたサポニンを含むADC、共有結合的に連結されたサポニンを含むAOC、半完成状態のADC、半完成状態のAOCのいずれかの使用に関する。

10

【0188】

本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の治療又は発症予防における使用のための前述のコンジュゲート、共有結合的に連結されたサポニンを含むADC、共有結合的に連結されたサポニンを含むAOC、半完成状態のADC、半完成状態のAOCのいずれかの使用に関する。

【実施例】

【0189】

実施例及び例示の実施形態

実施例1. $V_{HH}-SO1861+mAb$ -サポリン (1T2C及び2T2C)

1 標的2-構成成分系 (1T2C) は、 $V_{HH}-SO1861$ 及び mAb -タンパク質毒素の組み合わせ治療であり、 V_{HH} 及び mAb は、同じ細胞表面受容体を認識し、それに結合する (図1A)。2 標的2-構成成分系 (2T2C) は、 $V_{HH}-SO1861$ 及び mAb -タンパク質毒素の組み合わせ治療であり、 V_{HH} は、 mAb と異なる細胞表面受容体を認識し、それに結合する (図1B)。SO1861-EMCHを、(不安定な) 末端システイン残基 (Cys) を介してDAR1で抗HER2 V_{HH} にコンジュゲートした (HER2 $V_{HH}-SO1861$)。HER2 $V_{HH}-SO1861$ を、10 pMのCD71 mAb -サポリン (DAR4でタンパク質毒素、サポリンにコンジュゲートされたCD71モノクローナル抗体) 又は50 pMのトラスツズマブ-サポリン (DAR4でタンパク質毒素、サポリンにコンジュゲートされたトラスツズマブ) の固定された濃度に対して滴定した。SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺) 及びMDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅が決定された。これは、10 pMのCD71 mAb -サポリン又は50 pMのトラスツズマブ-サポリンとの両方の組み合わせに関してSK-BR-3において低濃度のHER2 $V_{HH}-SO1861$ での細胞死滅の亢進を明らかにした (IC50=300 nM; 図2A)。同濃度のHER2 $V_{HH}-SO1861$ 単独で、高濃度にて細胞死滅を誘導した一方で (IC50=4,000 nM)、同濃度のHER2 V_{HH} 、HER2 $V_{HH}+CD71 mAb$ -サポリン又はHER2 $V_{HH}+トラスツズマブ$ -サポリンは、細胞死滅活性を誘導できなかった (IC50>5000 nM; 図2A)。MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) において、HER2 $V_{HH}-SO1861+10 pM$ CD71 mAb -サポリンの組み合わせは、高濃度で細胞死滅活性を明らかにした一方で (IC50=2,000 nM; 図2B)、HER2 $V_{HH}-SO1861+50 pM$ トラスツズマブ-サポリンの組み合わせは、はるかに高い濃度で細胞死滅活性を示した (IC50>5,000 nM; 図2B)。同濃度のHER2 V_{HH} 、HER2 $V_{HH}+CD71 mAb$ -サポリン又はHER2 $V_{HH}+トラスツズマブ$ -サポリンは、MDA-MB-468細胞において細胞死滅活性を誘導できなかった (IC50>5,000 nM; 図2B)。

20

30

40

【0190】

これら全ては、SO1861-EMCHのHER2標的化 V_{HH} へのコンジュゲーションが、標的化されるタンパク質毒素 (同じ又は異なる細胞表面受容体を標的化する) のエンドソーム脱出及び細胞質内送達を高めて、HER2発現細胞の細胞死滅をもたらすこと

50

を示している。

【0191】

次に、トラスツズマブーサポリン又はCD71mab-サポリンを、900nM HER2V_{HH}-SO1861の固定された濃度に対して滴定し、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺) 及びMDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のトラスツズマブーサポリン又はCD71mab-サポリンと組み合わせた900nM HER2V_{HH}-SO1861で既に、SK-BR-3の効率的な細胞死滅を誘導した一方で (IC₅₀=0.0001pM; 図3A)、CD71mab-サポリン+900nM HER2V_{HH}又はトラスツズマブーサポリン+900nM HER2V_{HH}が、高濃度でのみ細胞死滅を誘導できたことを明らかにした (それぞれIC₅₀=50pM; IC₅₀=400pM; 図3)。MDA-MB-468細胞 (HER2⁻/CD71⁺) において、CD71mab-サポリン+900nM HER2V_{HH}-SO1861は、IC₅₀=0.01pMで細胞死滅を示した一方で、トラスツズマブーサポリン+900nM HER2V_{HH}-SO1861は、IC₅₀=2,000pMで活性を示した。トラスツズマブーサポリン+900nM HER2V_{HH}又はCD71mab-サポリン+900nM HER2V_{HH}は、(それぞれIC₅₀>10,000pM及びIC₅₀=20pM、図3B)でのみ細胞死滅を示した。このことは、相対的に低い濃度のトラスツズマブーサポリン又はCD71mab-サポリンが、HER2⁺⁺/CD71⁺発現細胞において相対的に低いHER2V_{HH}-SO1861 (DAR1) 濃度と組み合わせて効果的であり及び細胞死滅を誘導できることを示す。

【0192】

実施例2. V_{HH}-SO1861+V_{HH}-ジアンチン (2T2C)

2標的2-構成成分系 (2T2C) は、V_{HH}1-SO1861及びV_{HH}2-タンパク質毒素の組み合わせ治療であり、各V_{HH}は、別の細胞表面受容体を認識する (図1C)。SO1861-EMCHを、HER2を標的化するV_{HH}の末端システイン残基にコンジュゲートして、HER2V_{HH}-SO1861 (DAR1) を生成した。HER2V_{HH}-SO1861を、50nM CD71V_{HH}-ジアンチンの固定された濃度に対して滴定し、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺) 及びMDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、相対的に低い濃度のV_{HH}-HER2-L-SO1861で細胞死滅の亢進を明らかにした (SK-BR-3; IC₅₀=300nM; 図4A)。同濃度のHER2V_{HH}-SO1861単独で、高濃度にて細胞死滅を誘導した一方で (IC₅₀=4,000nM)、同濃度のHER2V_{HH}、HER2V_{HH}+50pM CD71V_{HH}-ジアンチンは、細胞死滅を誘導できなかった (IC₅₀>5,000nM; 図4A)。MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) において、HER2V_{HH}-SO1861+50pM CD71V_{HH}-ジアンチンの組み合わせは、より高い濃度で細胞死滅活性を明らかにした一方で (IC₅₀=600nM; 図4B)、同濃度のHER2V_{HH}、HER2V_{HH}-SO1861又はHER2V_{HH}+50pM CD71V_{HH}-ジアンチンは、細胞死滅活性を誘導できなかった (IC₅₀>5,000nM; 図4B)。

【0193】

次に、CD71V_{HH}-ジアンチンを、900nM HER2V_{HH}-SO1861の固定された濃度に対して滴定し、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺) 及びMDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のCD71V_{HH}-ジアンチンと組み合わせた900nM HER2V_{HH}-SO1861は、SK-BR-3細胞の効率的な細胞死滅を誘導した一方で (IC₅₀=0.05pM; 図5A)、CD71V_{HH}-ジアンチン又はCD71V_{HH}-ジアンチン+900nM HER2V_{HH}は、高濃度でのみ細胞死滅を誘導できた (IC₅₀>10,000pM; 図5A)。加えて、CD71V_{HH}-ジアンチンもまた、77nM トラスツズマブーSO1861 (DAR4) の固定された濃度に対

して滴定され、これはまた、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺) 細胞において細胞死滅活性の強力な強化を明らかにした ($IC_{50} < 0.0001 \text{ pM}$)。MDA-MB-468 細胞 (HER2⁻/CD71⁺) において、CD71V_{HH}-ジアンチン+900 nM HER2V_{HH}-SO1861 は、はるかに高い濃度でのみ細胞死滅を示した一方で ($IC_{50} = 10 \text{ pM}$ 、図5B)、CD71V_{HH}-ジアンチン、CD71V_{HH}-ジアンチン+900 nM HER2V_{HH}又はCD71V_{HH}-ジアンチン+トラスツズマブ-SO1861 (DAR4) は、 $IC_{50} = 2,000 \text{ pM}$ でのみ細胞死滅を示した (図5B)。

【0194】

これら全ては、相対的に低い濃度のV_{HH}CD71-ジアンチンが、高HER2/CD71発現細胞において低V_{HH}HER2-SO1861コンジュゲート濃度と組み合わせで効果的であり及び細胞死滅を誘導できることを示す。

【0195】

MDA-MB-468 細胞 (HER2⁻/CD71⁺) における本発明による組み合わせは、いずれの細胞死滅活性も明らかにしなかった。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内送達SO1861濃度が、タンパク質毒素のエンドソーム脱出及び細胞質内送達を誘導するための (閾値) に達しないことを示す。

【0196】

実施例3. V_{HH}-ジアンチン+mAb-SO1861 (1T2C及び2T2C)

1標的2-構成成分系 (1T2C) は、mAb-SO1861及びV_{HH}-タンパク質毒素の組み合わせ治療であり、mAb及びV_{HH}は、同じ細胞表面受容体を認識し、それに結合する (図1E)。2標的2-構成成分系 (2T2C) もまた、mAb-SO1861及びV_{HH}-タンパク質毒素の組み合わせ治療であり、mAb及びV_{HH}は、別の細胞表面受容体を認識する (図1D)。

【0197】

ジアンチン-C (末端システインを有するジアンチン) を、HER2を標的化するV_{HH}、CD71を標的化するV_{HH}又はEGFRを標的化するV_{HH}の末端システイン残基にコンジュゲートして、HER2V_{HH}-ジアンチン (DAR1)、CD71V_{HH}-ジアンチン (DAR1) 及びEGFRV_{HH}-ジアンチン (DAR1) を生成した。

【0198】

CD71V_{HH}-ジアンチン、HRE2V_{HH}-ジアンチン又はEGFRV_{HH}-ジアンチンを、セツキシマブ-SO1861 (DAR4) の固定された濃度に対して滴定し、A431 (EGFR⁺⁺/HER2^{+/}-/CD71⁺) 及びA2058 (EGFR⁻/HER2^{+/}-/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、77 nM セツキシマブ-SO1861と組み合わせた非常に低濃度のCD71V_{HH}-ジアンチンが、A431細胞の効率的な細胞死滅を誘導した一方で ($IC_{50} < 0.0001 \text{ pM}$; 図6A)、CD71V_{HH}-ジアンチン単独で、 $IC_{50} = 2000 \text{ pM}$ にて活性を示したことを明らかにした。他の2つの組み合わせEGFRV_{HH}-ジアンチン+77 nM セツキシマブ-SO1861及びHER2V_{HH}-ジアンチン+77 nM セツキシマブ-SO1861は、それぞれ $IC_{50} = 20 \text{ pM}$ 及び $IC_{50} = 50 \text{ pM}$ で効率的な細胞死滅を示した一方で、EGFRV_{HH}-ジアンチン又はHER2V_{HH}-ジアンチン単独で、A431細胞において効率的な細胞死滅を誘導できなかった ($IC_{50} > 10,000 \text{ pM}$; 図6A)。A2058細胞 (EGFR⁻/HER2^{+/}-/CD71⁺) において、CD71V_{HH}-ジアンチン及びCD71V_{HH}-ジアンチン+77 nM セツキシマブ-SO1861は、それぞれ $IC_{50} = 3,000 \text{ pM}$ 及び $IC_{50} = 1,000 \text{ pM}$ で細胞死滅活性を示した一方で、全ての他の治療又は組み合わせは、A2058細胞において $IC_{50} = 10,000 \text{ pM}$ V_{HH}-毒素まで細胞死滅を示さなかった (図6B)。

【0199】

これは、セツキシマブ-SO1861 (DAR4) が、3つの異なるV_{HH}-ジアンチ

10

20

30

40

50

ンコンジュゲートのエンドソーム脱出を効率的に誘導することによって、A431細胞において細胞死滅の亢進を誘導することができることを示す。

【0200】

次に、CD71V_{HH}-ジアンチン、HRE2V_{HH}-ジアンチン又はEGFRV_{HH}-ジアンチンを、トラスツズマブ-SO1861 (DAR4) の固定された濃度に対して滴定し、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/EGFR⁼/CD71⁺) 及びMDA-MB-468細胞 (HER2⁻/EGFR⁺⁺/CD71⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、77 nM トラスツズマブ-SO1861と組み合わせた非常に低濃度のCD71V_{HH}-ジアンチンが、SK-BR-3細胞の効率的な細胞死滅を誘導した一方で (IC50<0.0001 pM; 図7A)、CD71V_{HH}-ジアンチン単独で、IC50=10,000 pMにて活性を示したことを明らかにした。他の2つの組み合わせEGFRV_{HH}-ジアンチン+77 nM トラスツズマブ-SO1861及びHER2V_{HH}-ジアンチン+77 nM トラスツズマブ-SO1861は、それぞれIC50=400 pM及びIC50=6 pMで効率的な細胞死滅を示した一方で、EGFRV_{HH}-ジアンチン又はHER2V_{HH}-ジアンチン単独で、SK-BR-3細胞において効率的な細胞死滅を誘導できなかった (IC50>10,000 pM; 図7A)。MDA-MB-468細胞 (HER2⁻/EGFR⁺⁺/CD71⁺) において、CD71V_{HH}-ジアンチン及びCD71V_{HH}-ジアンチン+77 nM セツキシマブ-SO1861は、それぞれIC50=3000 pM及びIC50=2000 pMで細胞死滅活性を示した一方で、全ての他の治療又は組み合わせは、MDA-MB-468細胞においてIC50=10,000 pM V_{HH}-ジアンチンまで細胞死滅を示さなかった (図7B)。これは、トラスツズマブ-SO1861 (DAR4) が、3つの異なるV_{HH}-ジアンチンコンジュゲートのエンドソーム脱出を効率的に誘導することによって、SK-BR-3細胞において細胞死滅の亢進を誘導することができることを示す。

【0201】

材料及び方法

材料

SO1861は、サポナリア・オフィキナリス (*Saponaria officinalis*) から得られる生の植物抽出物からAnalyticon Discovery GmbHによって単離され、精製された。V_{HH}は、QVQ、Utrecht、The Netherlands (HER2V_{HH}: クローン名: Q17c; CD71V_{HH}: クローン名: Q52c EGFRV_{HH}: クローン名: Q86c) から購入された。トラスツズマブ (Tras、Herceptin (登録商標)、Roche)、セツキシマブ (Cet、Erbix (登録商標)、Merck KGaA) は、薬局 (Charite、Berlin) から購入された。CD71モノクローナル抗体は、BioCell (Okt9、#BE0023) から購入された。注文のトラスツズマブ-サポリン及び抗CD71 mab-サポリンコンジュゲートが製造され、Advanced Targeting Systems (San Diego、CA) から購入された。ジアンチン-Cys (Dia-Cys、単一のC末端システインを有するジアンチン変異体) は、Proteogenix、Franceによって製造された。

【0202】

トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP、98%、Sigma-Aldrich)、5,5-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB、エルマン試薬、99%、Sigma-Aldrich)、Zeba (商標) スピン脱塩カラム (2 mL、Thermo-Fisher)、NuPAGE (商標) 4-12% ビス-トリスタンパク質ゲル (Thermo-Fisher)、NuPAGE (商標) MES SDSランニング緩衝液 (Thermo-Fisher)、Novex (商標) Sharp事前染色済みタンパク質標準液 (Thermo-Fisher)、PageBlue (商標) タンパク質染色溶液 (Thermo-Fischer)、Pierce (商標) BCAタンパク質アッセイキット (Thermo-Fisher)、N-エチルマレイミド (NEM

、98%、Sigma-Aldrich)、1,4-ジチオスレイトール(DTT、98%、Sigma-Aldrich)、Sephadex G25(GE Healthcare)、Sephadex G50 M(GE Healthcare)、Superdex 200 P(GE Healthcare)、イソプロピルアルコール(IPA、99.6%、VWR)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス、99%、Sigma-Aldrich)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩(トリス・HCL、Sigma-Aldrich)、L-ヒスチジン(99%、Sigma-Aldrich)、無水D-(+)-トレハロース(99%、Sigma-Aldrich)、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウリン酸塩(TWEEN(登録商標) 20、Sigma-Aldrich)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS、Thermo-Fisher)、グアニジン塩酸塩(99%、Sigma-Aldrich)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物(EDTA- Na_2 、99%、Sigma-Aldrich)、滅菌フィルター0.2 μm 及び0.45 μm (Sartorius)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボン酸サクシニミジル(SMCC、Thermo-Fisher)、ビバスピント4及びT15濃縮機(Sartorius)、Superdex 200 PG(GE Healthcare)、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸テトラ(エチレングリコール)サクシニミジル(PEG4-S-PDP、Thermo-Fisher)、HSP27 BNAジスルフィドオリゴヌクレオチド(Biosynthesis)、[O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチルウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート](HATU、97%、Sigma-Aldrich)、ジメチルスルホキシド(DMSO、99%、Sigma-Aldrich)、N-(2-アミノエチル)マレイミドトリフルオロ酢酸塩(AEM、98%、Sigma-Aldrich)、L-システイン(98.5%、Sigma-Aldrich)、Ultrapure Lab Water Systems(MilliQ、Merck)から新鮮に得た脱イオン水(DI)、ニッケル-ニトリロ三酢酸アガロース(Ni-NTAアガロース、Protino)、グリシン(99.5%、VWR)、5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸(エルマン試薬、DTNB、98%、Sigma-Aldrich)、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物フルオレセイン(SAMSA試薬、Invitrogen)炭酸水素ナトリウム(99.7%、Sigma-Aldrich)、炭酸ナトリウム(99.9%、Sigma-Aldrich)、Sephadex G-25レジンを有するPD MiniTrap脱塩カラム(GE Healthcare)、PD10 G25脱塩カラム(GE Healthcare)、0.5、2、5、及び10mLにおけるZebaスピント脱塩カラム(Thermo-Fisher)、ビバスピント遠心フィルターT4 10kDa MWCO、T4 100kDa MWCO、及びT15(Sartorius)、Biosep s3000 aSECカラム(Phenomenex)、Vivacell限外濾過ユニット10及び30kDa MWCO(Sartorius)、Nalgene Rapid-Flowフィルター(Thermo-Fisher)。

【0203】

方法

SO1861-EMCH合成

SO1861(121mg、0.065mmol)及びEMCH・TFA(110mg、0.325mmol)に、メタノール(過乾燥、3.00mL)及びTFA(0.020mL、0.260mmol)を加えた。反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。¹生成物に対応する画分を直ちに合わせてプールし、凍結させ、一晚凍結乾燥させて、白色のふわふわした固体として標題の化合物(120mg、90%)を得た。LC-MSに基づく純度 96%。

LRMS (m/z): 2069 [M-1]¹⁻

LC-MS r.t. (分): 1.084

【0204】

細胞生存率アッセイ

処理の後、細胞を37℃で72時間インキュベートした後、細胞生存率を、製造業者の指示書(Cell Titer 96 (登録商標) Aqueous—溶液細胞増殖アッセイ、Promega)に従って実施されるMTS—アッセイによって決定した。簡潔には、MTS溶液を、10% FBSで補充されたフェノールレッド(PAN-Biotech GmbH)を伴わないDMEM中で20倍希釈した。細胞を、200μL/PBSウェルで1回洗浄した後、100μLの希釈されたMTS溶液をウェル毎に加えた。プレートを、37℃でおよそ20~30分間インキュベートした。その後、492nmでのODを、Thermo Scientific Multiskan FCプレートリーダー(Thermo Scientific)上で測定した。定量化のために、「培地のみ」のウェルのバックグラウンドシグナルを、全ての他のウェルから減算した後、処理/未処理細胞の細胞生存率のパーセンテージを、処理されたウェルのバックグラウンド補正シグナルを未処理ウェルのバックグラウンド補正シグナルで割ることによって計算した($\times 100$)。

【0205】

FACS分析

細胞を、10cmのディッシュ中において500,000c/プレートで、10%ウシ胎仔血清(PAN-Biotech GmbH)及び1% ペニシリン/ストレプトマイシン(PAN-Biotech GmbH)が補充されたDMEM(PAN-Biotech GmbH)中に播種し、90%の培養密度に達するまで48時間インキュベートした(5% CO₂、37℃)。次に、細胞をトリプシン処理して(Tryple Express、Gibco Thermo Scientific)、単一細胞にした。0.75 $\times 10^6$ 個の細胞を15mLのファルコンチューブに移し、遠心分離した(1,400rpm、3分)。細胞ペレットを浸したまま上清を捨てた。ペレットを、ボルテックス振盪機上でファルコンチューブを緩やかにタッピングすることにより解離させ、細胞を4mLの冷PBS(Mg²⁺及びCa²⁺遊離、2% FBS)で洗浄した。洗浄の後、細胞を、3mLの冷PBS(Mg²⁺及びCa²⁺遊離、2% FBS)中で再懸濁させ、3つの丸底FACSチューブ(1mL/チューブ)に等しく分割した。細胞を再度遠心分離し、200μLの冷PBS(Mg²⁺及びCa²⁺遊離、2% FBS)又は195μLの冷PBS(Mg²⁺及びCa²⁺遊離、2% FBS)中の5μLの抗体を含有する200μL 抗体溶液中で再懸濁させた。APCマウスIgG1、κAPC抗ヒトEGFR(#352906、Biolegend)を使用して、EGFR受容体を染色した。PE抗ヒトHER2APC抗ヒトCD340(erbB2/HER-2)(#324408 Biolegend)を使用して、HER2受容体を染色し、PEマウスIgG2a、κアイソタイプCtrl FC(#400212、Biolegend)をそれに見合うアイソタイプ対照として使用した。PE抗ヒトCD71(#334106、Biolegend)を使用して、CD71受容体を染色し、PEマウスIgG2a、κアイソタイプCtrl FC(#400212、Biolegend)をそれに見合うアイソタイプ対照として使用した。試料を、チューブローラーミキサー上において4℃で30分間インキュベートした。その後、細胞を、冷PBS(Mg²⁺及びCa²⁺遊離、2% FBS)で3回洗浄し、PBS中の2% PFA溶液を使用して室温で20分間固定した。細胞を冷PBSで2回洗浄し、FACS分析のために250~350μLの冷PBS中で再懸濁した。試料をBD FACSCanto IIフローサイトメトリーシステム(BD Biosciences)及びFlowJoソフトウェアで分析した。様々な細胞に対するEGFR、HER2及びCD71の細胞表面発現の分析の結果は、表A2において要約される。

【0206】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 A2. 様々な細胞の EGFR, HER2 及び CD71 の細胞表面発現レベル

細胞株	EGFR 発現レベル (MFI)	HER2 発現レベル (MFI)	CD71 発現レベル (MFI)
MDA-MB-468	1656	1	186
A431	1593	10	322
SK-BR-3	28	1162	331
A2058	1	5	59

10

【0207】

V_{HH}-SO1861 のコンジュゲーションのための手順

一定分量の V_{HH} に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液（10.0 mg/ml）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20℃ で 30 分間インキュベートした。インキュベーションの後、得られた V_{HH}-SH を、z e b a スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により TBS pH 7.5 に精製した。得られた V_{HH}-SH に、新たに調製された SPT-EMCH 溶液を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で一晩インキュベートした。

20

【0208】

インキュベーションの後、一定分量の V_{HH}-SO1861 混合物を除去し、エルマンアッセイによって特徴付けて、SO1861 の組み込みを確認した。コンジュゲートを、DPBS pH 7.5 で溶出する 1.6 × 35 cm Superdex 200 PG カラムによって精製して、精製された V_{HH}-SO1861 を得た。一定分量を 0.2 μm に濾過し、濃縮し、1.0 mg/ml まで標準化して、V_{HH}-SO1861 を得た。

【0209】

V_{HH}-ジアンチンのコンジュゲーションのための手順

ジアンチン-Cys を、ビバスピン T15 10 KDa MWCO 遠心フィルターを使用して限外濾過により濃縮し、TBS pH 7.5 に緩衝液交換した。濃縮されたジアンチン-Cys に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液（10.0 mg/ml）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20℃ で 60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、得られたジアンチン-SH を、z e b a スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製し、続いてビバスピン T15 10 KDa MWCO 遠心フィルターを使用して遠心洗浄サイクルを繰り返して TBS pH 7.5 にした。得られたジアンチン-SH を、DMSO 中で新たに調製された DTME 溶液（10 mg/ml）と反応させ、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で 60 分間インキュベートした。その後、ジアンチン-DTME を、TBS pH 7.5 にする z e b a スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過による精製の後に得た。ジアンチン-DTME を、コンジュゲートされるまで 20℃ で保管した。同時に、一定分量の V_{HH} を、ビバスピン T15 10 KDa MWCO 遠心フィルターを使用して限外濾過により濃縮し、TBS pH 7.5 に緩衝液交換した。濃縮された V_{HH} に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液（10.0 mg/ml）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 37℃ で 60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、得られた V_{HH} を、z e b a スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製し、続いてビバスピン T4 5 KDa MWCO 遠心フィルターを使用して遠心洗浄サイクルを繰り返して TBS pH 7.5 にした。一定分量の得られた V_{HH}-SH を、ジアンチン-DTME と反応させ、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で一晩インキュベートした。その後、反応混

30

40

50

合物を、ビバスピント 4 10 KDa MWCO 遠心チューブを使用して濃縮し、DPBS pH 7.5 に溶出する 1.6 × 35 cm Superdex 200 PG カラムを使用してゲル濾過により精製した。

【0210】

抗体- (L-SO1861) 4

トラスツズマブ、セツキシマブは、後で「Ab」と称される。Ab は、1、2、3、4、5、及び 6 の DAR でマイケル型チオール-エンコンジュゲーション反応を介してサポニン SO18161-EMCH にコンジュゲートされた。SO1861-EMCH 分子は、その構造とそのマレイミド官能基の間に不安定な (L) ヒドラゾン結合を得て、サポニンと Ab の間に不安定な結合を生成する。手順は、トラスツズマブ- (L-SO1861) 4 に関して例示的に記載される。

10

【0211】

セツキシマブ (40 mg、8.0 ml) の溶液に、トリス濃縮物 (127 mg/ml、1.05 M)、トリス・HCl 濃縮物 (623 mg/ml、3.95 M) 及び EDTA-Na₂ 濃縮物 (95 mg/ml、0.26 M) の 10 µl/ml の各々を加えて、50 mM TBS、2.5 mM EDTA 緩衝液 pH 7.5 を得た。

【0212】

4 つの部分に分割されたセツキシマブ (それぞれ 9.73 mg、4.864 mg/ml、65 nmol) に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液 (0.5 ~ 2.0 mg/ml、1.15 ~ 7.02 モル当量、75 ~ 455 nmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20 °C で 300 分間インキュベートした。インキュベーションの後 (SO1861-EMCH の添加の前)、約 1 mg (0.210 ml) の一定分量の Ab-SH を各混合物から除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピンド脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis 分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (それぞれのチオール対 Ab 比 = 2.0、4.2、5.9 及び 6.8)。原体 Ab-SH の各々に、一定分量の新たに調製された SO1861-EMCH 溶液 (2 mg/ml、「チオール」当たり 1.3 モル当量、0.15 ~ 0.61 µmol、0.16 ~ 0.63 ml) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20 °C で 120 分間インキュベートした。各コンジュゲーション反応に加えて、2 つの一定分量の脱塩された Ab-SH (0.25 mg、1.67 nmol) を、それぞれ陽性対照及び陰性対照として NEM (「チオール」当たり 1.3 モル当量、4.3 ~ 17.4 nmol、2.2 ~ 8.7 µl の 0.25 mg/ml 溶液) 又は TBS pH 7.5 緩衝液 (2.2 ~ 8.7 µl) と 20 °C で 120 分間反応させた。インキュベーションの後 (NEM の添加の前)、0.200 ml の一定分量の Ab-SO1861-EMCH 混合物を除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピンド脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-vis により特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、SO1861-EMCH の組み込みを得た。原体 Ab-SO1861-EMCH 混合物に、一定分量の新たに調製された NEM 溶液 (2.5 mg/ml、2.5 ~ 10 モル当量、0.15 ~ 0.58 µmol) を加え、混合物を DPBS pH 7.5 で溶出する zeba スピンド脱塩カラムにより精製して、精製されたセツキシマブ- (L-SO1861) コンジュゲートを得た。生成物を 2.5 mg/ml に標準化し、0.2 µm に濾過した後、生物学的評価のために分注した。トラスツズマブ-L-SO1861 コンジュゲートに関する反応条件及び結果並びにセツキシマブ-L-SO1861 コンジュゲートに関する反応条件及び結果は、表 A3 及び表 A4 において要約される。

20

30

40

【0213】

50

【表 6】

表 A3. 要約された反応条件及びトラスツズマブ-L-SO1861 コンジュゲートに関する結果

バッチ	Ab 供給	TCEP 供給モル 当量	SO1861- EMCH 供給	得られる DAR	分析的 SEC による 純度 (%)	収率 (%)
Tras-(L- SO1861) ₄	9.91 mg 66 nmol	3.83	0.46 μmol	4.0	98.4	81

10

【0214】

【表 7】

表 A4. 要約された反応条件及びセツキシマブ-L-SO1861 コンジュゲートに関する結果

バッチ	Ab 供給	TCEP 供給モル 当量	SO1861- EMCH 供給	得られる DAR	分析的 SEC による 純度 (%)	収率 (%)
Cet-(L- SO1861) ₄	9.73 mg 65 nmol	4.19	0.46 μmol	4.1	99.0	77

20

【0215】

材料

明細書、特許請求の範囲及び図面全体を通して、「V_{HH}」、「V_{hh}」、「V_h」及び「V_{HH}」は、同じ型の単ドメイン抗体を参照するものとして理解されるべきである。「V_H」、「V_h」、「V_h」及び「V_H」のいずれかとして参照される型の単ドメイン抗体についても同様である。

30

【0216】

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、CD71-V_{HH}（購入される）、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP、98%、Sigma-Aldrich）、5,5-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（DTNB、エルマン試薬、99%、Sigma-Aldrich）、Zeba（商標）スピン脱塩カラム（2mL、Thermo-Fisher）、NuPAGE（商標）4-12% ビス-トリスタンパク質ゲル（Thermo-Fisher）、NuPAGE（商標）MES SDSランニング緩衝液（Thermo-Fisher）、Novex（商標）Sharp事前染色済みタンパク質標準液（Thermo-Fisher）、PageBlue（商標）タンパク質染色溶液（Thermo-Fisher）、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（Thermo-Fisher）、N-エチルマレイミド（NEM、98%、Sigma-Aldrich）、1,4-ジチオスレイトール（DTT、98%、Sigma-Aldrich）、Sephadex G25（GE Healthcare）、Sephadex G50 M（GE Healthcare）、Superdex 200P（GE Healthcare）、イソプロピルアルコール（IPA、99.6%、VWR）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス、99%、Sigma-Aldrich）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（トリス・HCL、Sigma-Aldrich）、L-ヒスチジン（99%、Sigma-Aldrich）、無水D-（+）-トレハロース（99%、Sigma-Aldrich）、ポリエチレングリ

40

50

コールソルビタンモノラウリン酸塩 (TWEEN (登録商標) 20、Sigma-Aldrich)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS、Thermo-Fisher)、グアニジン塩酸塩 (99%、Sigma-Aldrich)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物 (EDTA- Na_2 、99%、Sigma-Aldrich)、滅菌フィルター0.2 μm 及び0.45 μm (Sartorius)、ビバスピント4及びT15濃縮機 (Sartorius)、Superdex 200PG (GE Healthcare)、HSP27 BNAジスルフィドオリゴヌクレオチド (Biosynthesis)、[O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチルウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート] (HATU、97%、Sigma-Aldrich)、ジメチルスルホキシド (DMSO、99%、Sigma-Aldrich)、N-(2-アミノエチル) マレイミドトリフルオロ酢酸塩 (AEM、98%、Sigma-Aldrich)、L-システイン (98.5%、Sigma-Aldrich)、Ultrapure Lab Water Systems (MilliQ、Merck) から新鮮に得た脱イオン水 (DI)、ニッケル-ニトリロ三酢酸アガロース (Ni-NTAアガロース、Protino)、グリシン (99.5%、VWR)、5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸 (エルマン試薬、DTNB、98%、Sigma-Aldrich)、炭酸水素ナトリウム (99.7%、Sigma-Aldrich)、炭酸ナトリウム (99.9%、Sigma-Aldrich)、Sephadex G-25レジンを含むPD MiniTrap脱塩カラム (GE Healthcare)、PD10 G25脱塩カラム (GE Healthcare)、0.5、2、5、及び10 mLにおけるZebaスピン脱塩カラム (Thermo-Fisher)、ビバスピンド心フィルターT4 10 kDa MWCO、T4 100 kDa MWCO、及びT15 (Sartorius)、Biosep s3000 aSECカラム (Phenomenex)、Vivacell 限外濾過ユニット10及び30 kDa MWCO (Sartorius)、Nalgene Rapid-Flowフィルター (Thermo-Fisher)、アクリルアミド (99.9%、Sigma-Aldrich)、ドデシル硫酸ナトリウム (98%、Sigma-Aldrich)、過硫酸アンモニウム (APS、98%、Sigma-Aldrich)、グリセロール (99%、Sigma-Aldrich)、プロモフェノールブルー (Sigma-Aldrich)、ポリエチレングリコールドデシルエーテル (Brij-35、Sigma-Aldrich)。全てのSO1861誘導体 (SO1861-EMCH、SO1861-AEM、デンドロン-[L-SO1861]n)、全てのQS21誘導体 (QS21-EMCH、QS21-AEM、デンドロン-[L-QS21]n)、及び三官能性リンカー誘導体が内製された。

[0217]

合成

1. $\text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{三官能性リンカー} - (\text{L} - \text{SO1861}) - (\text{L} - \text{HSP27 BNA})]_4$

$\text{HER2} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{L} - \text{SO1861}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、 $\text{HER2} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、

$\text{EGFR} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{L} - \text{SO1861}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、 $\text{EGFR} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、

$\text{CD71} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{L} - \text{SO1861}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、 $\text{CD71} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (\text{L} - \text{HSP27})]_4$ 、

$\text{HER2} - \text{V}_{\text{HH}}$ 、 $\text{EGFR} - \text{V}_{\text{HH}}$ 、及び $\text{CD71} - \text{V}_{\text{HH}}$ は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称されるHSP27 BNA誘導体を有する2つの異なるマレイミド (Mal) にコンジュゲートされた。これらのHSP27-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(L-SO1861)-(L-HSP27 BNA)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-HSP27 BNA)であった。手順は、 $\text{HER2} - \text{V}_{\text{HH}} - [\text{S} - \text{三官能性リンカー} - (\text{L} - \text{SO1861}) - (\text{L} - \text{HSP27 BNA})]_4$ につ

いて例示的に記載される：

A bを、脱イオン水（D I）で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH 6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg（4.0ml）の一定分量に、トリス濃縮物（127mg/ml、1.05M）、トリス・HCl濃縮物（623mg/ml、3.95M）及びEDTA-Na₂濃縮物（95mg/ml、0.26M）の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH 7.5を得た。

【0218】

A b（2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol）に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液（1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後（コンストラクトの添加の前）、約0.2mg（0.044ml）の一定分量のA b-SHを各混合物から除去し、TBS pH 7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた（チオール対a b比=4.0）。原体A b-SHを、2つの一定分量（0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol）に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のHSP27 BNA-Mal誘導体1-2の各々（TBS pH 7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。A b-HSP27 BNA誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたA b-SH（50μg、3.3nmol）を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM（「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液）又はTBS pH 7.5緩衝液（6.7μl）と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後（NEMの添加の前）、0.100mlの一定分量のA b-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH 7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA誘導体2の組み込みを得た。各原体A b-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液（0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol）を加え、混合物を、DPBS pH 7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100kDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたA b-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0219】

2. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-HSP27 BNA)]₄

HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-HSP27)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「A b」と称される。A bは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称されるHSP27 BNA誘導体を有する2つの異なるマレイミド（Mal）にコンジュゲートされた。これらのHSP27-Mal誘導体は、すなわち：1）Mal-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-HSP27 BNA)、2）Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-HSP27 BNA)であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-HSP27 BNA)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水(DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg(4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物(127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物(623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物(95mg/ml、0.26M)の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0220】

Ab(2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液(1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後(コンストラクトの添加の前)、約0.2mg(0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた(チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量(0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のHSP27 BNA-Mal誘導体1-2の各々(TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-HSP27 BNA誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH(50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM(「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液(6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後(NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液(0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100kDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0221】

3. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-SO1861)_n)-(L-HSP27 BNA)]₄

HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-SO1861)_n)-(L-HSP27)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-SO1861)_n)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-SO1861)_n)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称されるHSP27 BNA誘導体を有する2つの異なるマレイミド(Mal)にコンジュゲートされた。これらのHSP27-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-SO1861)_n)-(L-HSP27 BNA)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-HSP27 BNA)であった。「n」は、4、8、又は8より多いSO1861分子の数を指す。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-SO1861)₄)-(L-HSP27 BNA)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水(DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg(4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物(127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物(623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物(95mg/ml、0.26M)の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0222】

Ab(2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液(1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後(コンストラクトの添加の前)、約0.2mg(0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた(チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量(0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のHSP27 BNA-Mal誘導体1-2の各々(TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-HSP27 BNA誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH(50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM(「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液(6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後(NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液(0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100kDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0223】

4. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-HSP27 BNA)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-HSP27)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ(遮断)-(L-HSP27)]₄、
EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ(遮断)-(L-HSP27)]₄、
CD71-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ(遮断)-(L-HSP27)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称されるHSP27 BNA誘導体を有する2つの異なるマレイミド(Mal)にコンジュゲートされた。これらのHSP27-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-HSP27 BNA)、2) Mal-三官能性リンカー(遮断)-(L-HSP27 BNA)であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-HSP27 BNA)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水(DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg(4.0ml)の一定分量に、トリス濃

縮物 (127 mg/ml、1.05 M)、トリス・HCl 濃縮物 (623 mg/ml、3.95 M) 及び EDTA-Na₂ 濃縮物 (95 mg/ml、0.26 M) の 10 µl/ml の各々を加えて、50 mM TBS、2.5 mM EDTA 緩衝液 pH 7.5 を得た。

【0224】

Ab (2.1 mg、0.5 mg/ml、0.14 µmol) に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液 (1.00 mg/ml、2.35 モル当量、0.32 µmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20℃ で 90 分間インキュベートした。インキュベーションの後 (コンストラクトの添加の前)、約 0.2 mg (0.044 ml) の一定分量の Ab-SH を各混合物から除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis 分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対 ab 比 = 4.0)。原体 Ab-SH を、2 つの一定分量 (0.11 mg、7.6 nmol 及び 0.12 mg、8.3 nmol) に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量の HSP27 BNA-Mal 誘導体 1-2 の各々 (TBS pH 7.5 中で新たに調製される、2 mg/ml、「チオール」当たり 1.3 モル当量、40 nmol 及び 43 nmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で 120 分間インキュベートした。Ab-HSP27 BNA 誘導体 2 のコンジュゲーション反応に加えて、2 つの一定分量の脱塩された Ab-SH (50 µg、3.3 nmol) を、それぞれ陽性対照及び陰性対照として NEM (「チオール」当たり 1.3 モル当量、17.3 nmol、6.7 µl の 0.25 mg/ml 溶液) 又は TBS pH 7.5 緩衝液 (6.7 µl) と 20℃ で 120 分間反応させた。インキュベーションの後 (NEM の添加の前)、0.100 ml の一定分量の Ab-コンストラクト 2 の混合物を除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-vis により特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA 誘導体 2 の組み込みを得た。各原体 Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製された NEM 溶液 (0.25 mg/ml、2.5 モル当量、19 及び 21 nmol) を加え、混合物を、DPBS pH 7.5 で溶出する 1.6 × 30 cm Sephadex G50 M を使用するゲル濾過により精製した後、100 KDa MWCO 濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製された Ab-コンストラクト 1-2 コンジュゲートを得た。生成物を 0.2 µm に濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0225】

5. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-HSP27 BNA)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-HSP27)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、
EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、
CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及び CD71-V_{HH} は、後で「Ab」と称される。Ab は、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称される HSP27 BNA 誘導体を有する 2 つの異なるマレイミド (Mal) にコンジュゲートされた。これらの HSP27-Mal 誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-HSP27 BNA)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-HSP27 BNA) であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-HSP27 BNA)]₄ について例示的に記載される：

Ab を、脱イオン水 (DI) で 21 mg/ml に再構成し、続いてヒスチジン緩衝液 pH 6 を使用して 5 mg/ml に希釈した。20 mg (4.0 ml) の一定分量に、トリス濃縮物 (127 mg/ml、1.05 M)、トリス・HCl 濃縮物 (623 mg/ml、3.95 M) 及び EDTA-Na₂ 濃縮物 (95 mg/ml、0.26 M) の 10 µl/ml

lの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0226】

Ab (2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液 (1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後 (コンストラクトの添加の前)、約0.2mg (0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量 (0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のHSP27 BNA-Mal誘導体1-2の各々 (TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-HSP27 BNA誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH (50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM (「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液 (6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後 (NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液 (0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100kDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0227】

6. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-HSP27 BNA)]₄

HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-HSP27)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-HSP27)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-HSP27)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-HSP27)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「HSP27-Mal」と称されるHSP27 BNA誘導体を有する2つの異なるマレイミド (Mal)にコンジュゲートされた。これらのHSP27-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-HSP27 BNA)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-HSP27 BNA)であった。「n」は、4、8、又は8より多いQS21分子の数を指す。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-QS21)₄)-(L-HSP27 BNA)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水 (DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg (4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物 (127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物 (623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物 (95mg/ml、0.26M)の10μl/m

lの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0228】

Ab (2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液 (1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後 (コンストラクトの添加の前)、約0.2mg (0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量 (0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のHSP27 BNA-Mal誘導体1-2の各々 (TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-HSP27 BNA誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH (50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM (「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液 (6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後 (NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、HSP27 BNA誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液 (0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100kDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0229】

7. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する2つの異なるマレイミド (Mal)にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-ジアンチン)であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水 (DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg (4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物 (127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物 (623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物 (95mg/ml、0.26M)の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0230】

Ab (2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製

されたTCEP溶液（1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後（コンストラクトの添加の前）、約0.2mg（0.044ml）の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた（チオール対ab比=4.0）。原体Ab-SHを、2つの一定分量（0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol）に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal誘導体1-2の各々（TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH（50μg、3.3nmol）を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM（「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液）又はTBS pH7.5緩衝液（6.7μl）と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後（NEMの添加の前）、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液（0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol）を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100KDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0231】

8. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する2つの異なるマレイミド（Mal）にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal誘導体は、すなわち：1）Mal-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)、2）Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-ジアンチン)であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-SO1861)-(L-ジアンチン)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水（DI）で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg（4.0ml）の一定分量に、トリス濃縮物（127mg/ml、1.05M）、トリス・HCl濃縮物（623mg/ml、3.95M）及びEDTA-Na₂濃縮物（95mg/ml、0.26M）の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0232】

Ab（2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol）に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液（1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol）を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後（コンストラクトの添加の前）、約0.2mg（

0.044 ml) の一定分量の Ab-SH を各混合物から除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis 分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対 a b 比 = 4.0)。原体 Ab-SH を、2 つの一定分量 (0.11 mg、7.6 nmol 及び 0.12 mg、8.3 nmol) に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal 誘導体 1-2 の各々 (TBS pH 7.5 中で新たに調製される、2 mg/ml、「チオール」当たり 1.3 モル当量、40 nmol 及び 43 nmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で 120 分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体 2 のコンジュゲーション反応に加えて、2 つの一定分量の脱塩された Ab-SH (50 µg、3.3 nmol) を、それぞれ陽性対照及び陰性対照として NEM (「チオール」当たり 1.3 モル当量、17.3 nmol、6.7 µl の 0.25 mg/ml 溶液) 又は TBS pH 7.5 緩衝液 (6.7 µl) と 20℃ で 120 分間反応させた。インキュベーションの後 (NEM の添加の前)、0.100 ml の一定分量の Ab-コンストラクト 2 の混合物を除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-vis により特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体 2 の組み込みを得た。各原体 Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製された NEM 溶液 (0.25 mg/ml、2.5 モル当量、19 及び 21 nmol) を加え、混合物を、DPBS pH 7.5 で溶出する 1.6 × 30 cm Sephadex G50M を使用するゲル濾過により精製した後、100 kDa MWCO 濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製された Ab-コンストラクト 1-2 コンジュゲートを得た。生成物を 0.2 µm に濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0233】

9. $V_{HH} - [S - \text{三官能性リンカー} - (S - \text{デンドロン} - (L - SO1861)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$

HER2- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - SO1861)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、HER2- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、EGFR- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - SO1861)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、EGFR- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、CD71- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - SO1861)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、CD71- $V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、

HER2- V_{HH} 、EGFR- V_{HH} 、及び CD71- V_{HH} は、後で「Ab」と称される。Ab は、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する 2 つの異なるマレイミド (Mal) にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal 誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー (S-デンドロン (L-SO1861)_n) - (L-ジアンチン)、2) Mal-三官能性リンカー (遮断) - (L-ジアンチン) であった。「n」は、4、8、又は 8 より多い SO1861 分子の数を指す。手順は、HER2- $V_{HH} - [S - \text{三官能性リンカー} - (S - \text{デンドロン} - (L - SO1861)_4) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ について例示的に記載される：

Ab を、脱イオン水 (DI) で 21 mg/ml に再構成し、続いてヒスチジン緩衝液 pH 6 を使用して 5 mg/ml に希釈した。20 mg (4.0 ml) の一定分量に、トリス濃縮物 (127 mg/ml、1.05 M)、トリス・HCl 濃縮物 (623 mg/ml、3.95 M) 及び EDTA-Na₂ 濃縮物 (95 mg/ml、0.26 M) の 10 µl/ml の各々を加えて、50 mM TBS、2.5 mM EDTA 緩衝液 pH 7.5 を得た。

【0234】

Ab (2.1 mg、0.5 mg/ml、0.14 µmol) に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液 (1.00 mg/ml、2.35 モル当量、0.32 µmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20℃ で 90 分間インキュベートした。インキュベーションの後 (コンストラクトの添加の前)、約 0.2 mg (

0.044 ml) の一定分量の Ab-SH を各混合物から除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis 分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対 a b 比 = 4.0)。原体 Ab-SH を、2 つの一定分量 (0.11 mg、7.6 nmol 及び 0.12 mg、8.3 nmol) に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal 誘導体 1-2 の各々 (TBS pH 7.5 中で新たに調製される、2 mg/ml、「チオール」当たり 1.3 モル当量、40 nmol 及び 43 nmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて 20℃ で 120 分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体 2 のコンジュゲーション反応に加えて、2 つの一定分量の脱塩された Ab-SH (50 µg、3.3 nmol) を、それぞれ陽性対照及び陰性対照として NEM (「チオール」当たり 1.3 モル当量、17.3 nmol、6.7 µl の 0.25 mg/ml 溶液) 又は TBS pH 7.5 緩衝液 (6.7 µl) と 20℃ で 120 分間反応させた。インキュベーションの後 (NEM の添加の前)、0.100 ml の一定分量の Ab-コンストラクト 2 の混合物を除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-vis により特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体 2 の組み込みを得た。各原体 Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製された NEM 溶液 (0.25 mg/ml、2.5 モル当量、19 及び 21 nmol) を加え、混合物を、DPBS pH 7.5 で溶出する 1.6 × 30 cm Sephadex G50M を使用するゲル濾過により精製した後、100 kDa MWCO 濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製された Ab-コンストラクト 1-2 コンジュゲートを得た。生成物を 0.2 µm に濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0235】

10. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-ジアンチン)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
CD71-V_{HH}-[S-トリ-(L-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及び CD71-V_{HH} は、後で「Ab」と称される。Ab は、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する 2 つの異なるマレイミド (Mal) にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal 誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-ジアンチン)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-ジアンチン) であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(L-QS21)-(L-ジアンチン)]₄ について例示的に記載される：

Ab を、脱イオン水 (DI) で 21 mg/ml に再構成し、続いてヒスチジン緩衝液 pH 6 を使用して 5 mg/ml に希釈した。20 mg (4.0 ml) の一定分量に、トリス濃縮物 (127 mg/ml、1.05 M)、トリス・HCl 濃縮物 (623 mg/ml、3.95 M) 及び EDTA-Na₂ 濃縮物 (95 mg/ml、0.26 M) の 10 µl/ml の各々を加えて、50 mM TBS、2.5 mM EDTA 緩衝液 pH 7.5 を得た。

【0236】

Ab (2.1 mg、0.5 mg/ml、0.14 µmol) に、一定分量の新たに調製された TCEP 溶液 (1.00 mg/ml、2.35 モル当量、0.32 µmol) を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により 20℃ で 90 分間インキュベートした。インキュベーションの後 (コンストラクトの添加の前)、約 0.2 mg (0.044 ml) の一定分量の Ab-SH を各混合物から除去し、TBS pH 7.5 にする zeba スピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis 分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた (チオール対 a b 比 = 4

・0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量(0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal誘導体1-2の各々(TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH(50µg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM(「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7µlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液(6.7µl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後(NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaスピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液(0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100KDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2µmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0237】

11. V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-ジアンチン)]₄
HER2-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、HER2-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、EGFR-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、
CD71-V_{HH}-[S-トリ-(S-QS21)-(L-ジアンチン)]₄、CD71-V_{HH}-[S-トリ-(遮断)-(L-ジアンチン)]₄、

HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}、及びCD71-V_{HH}は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する2つの異なるマレイミド(Mal)にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-ジアンチン)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-ジアンチン)であった。手順は、HER2-V_{HH}-[S-三官能性リンカー-(S-QS21)-(L-ジアンチン)]₄について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水(DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg(4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物(127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物(623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物(95mg/ml、0.26M)の10µl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0238】

Ab(2.1mg、0.5mg/ml、0.14µmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液(1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32µmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後(コンストラクトの添加の前)、約0.2mg(0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaスピン脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた(チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量(0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal誘導体1-2の各々(TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「

チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH(50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM(「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液(6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後(NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液(0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100KDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0239】

12. $V_{HH} - [S - \text{三官能性リンカー} - (S - \text{デンドロン} - (L - QS21)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$

$HER2 - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - QS21)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、 $HER2 - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、

$EGFR - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - QS21)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、 $EGFR - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、

$CD71 - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (S - \text{デンドロン} - (L - QS21)_n) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、 $CD71 - V_{HH} - [S - \text{トリ} - (\text{遮断}) - (L - \text{ジアンチン})]_4$ 、

$HER2 - V_{HH}$ 、 $EGFR - V_{HH}$ 、及び $CD71 - V_{HH}$ は、後で「Ab」と称される。Abは、マイケル型チオール-エン反応を介して、後で「ジアンチン-Mal」と称されるジアンチン誘導体を有する2つの異なるマレイミド(Mal)にコンジュゲートされた。これらのジアンチン-Mal誘導体は、すなわち：1) Mal-三官能性リンカー-(S-デンドロン-(L-QS21)_n)-(L-ジアンチン-Mal)、2) Mal-三官能性リンカー-(遮断)-(L-ジアンチン-Mal)であった。「n」は、4、8、又は8より多いQS21分子の数を指す。手順は、 $HER2 - V_{HH} - [S - \text{三官能性リンカー} - (S - \text{デンドロン} - (L - QS21)_4) - (L - \text{ジアンチン} - Mal)]_4$ について例示的に記載される：

Abを、脱イオン水(DI)で21mg/mlに再構成し、続いてヒスチジン緩衝液pH6を使用して5mg/mlに希釈した。20mg(4.0ml)の一定分量に、トリス濃縮物(127mg/ml、1.05M)、トリス・HCl濃縮物(623mg/ml、3.95M)及びEDTA-Na₂濃縮物(95mg/ml、0.26M)の10μl/mlの各々を加えて、50mM TBS、2.5mM EDTA緩衝液pH7.5を得た。

【0240】

Ab(2.1mg、0.5mg/ml、0.14μmol)に、一定分量の新たに調製されたTCEP溶液(1.00mg/ml、2.35モル当量、0.32μmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いてローラー混合により20℃で90分間インキュベートした。インキュベーションの後(コンストラクトの添加の前)、約0.2mg(0.044ml)の一定分量のAb-SHを各混合物から除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。これらの一定分量は、UV-vis分析及びエルマンアッセイにより特徴付けられた(チオール対ab比=4.0)。原体Ab-SHを、2つの一定分量(0.11mg、7.6nmol及び0.12mg、8.3nmol)に分割し、それぞれの一定分量に、一定分量のジアンチン-Mal誘導体1-2の各々(TBS pH7.5中で新たに調製される、2mg/ml、「

チオール」当たり1.3モル当量、40nmol及び43nmol)を加え、混合物を短時間ボルテックスし、続いて20℃で120分間インキュベートした。Ab-ジアンチン誘導体2のコンジュゲーション反応に加えて、2つの一定分量の脱塩されたAb-SH(50μg、3.3nmol)を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてNEM(「チオール」当たり1.3モル当量、17.3nmol、6.7μlの0.25mg/ml溶液)又はTBS pH7.5緩衝液(6.7μl)と20℃で120分間反応させた。インキュベーションの後(NEMの添加の前)、0.100mlの一定分量のAb-コンストラクト2の混合物を除去し、TBS pH7.5にするzebaspin脱塩カラムを使用するゲル濾過により精製した。この一定分量を、UV-visにより特徴付けし、陽性対照及び陰性対照を並べてエルマンアッセイにより特徴付けして、ジアンチン誘導体2の組み込みを得た。各原体Ab-コンストラクト混合物に、一定分量の新たに調製されたNEM溶液(0.25mg/ml、2.5モル当量、19及び21nmol)を加え、混合物を、DPBS pH7.5で溶出する1.6×30cm Sephadex G50Mを使用するゲル濾過により精製した後、100KDa MWCO濃縮機を使用して遠心濾過及び洗浄を繰り返して、精製されたAb-コンストラクト1-2コンジュゲートを得た。生成物を0.2μmに濾過した後、生物学的評価のために分注した。

【0241】

実施例4

本発明のコンジュゲート。図1F~Iは、本発明の4つの典型的な分子集合体又はコンジュゲート(共有結合性複合体)を示す。これらのコンジュゲートは、細胞系バイオアッセイ、インビボ動物モデルなどにおいて試験するために製造され、精製される。

【0242】

図1Fは、IgG(又はいくつかの実施形態ではsdAb)などの標的化リガンドと複合体を形成した(共有結合された)少なくとも1つのサポニン部分「S」を含む本発明によるエンドソーム/リソソーム脱出強化コンジュゲートを表す模式図であり、サポニンは、抗体に直接的に連結されるか、又は(切断可能な)リンカーを介して抗体に結合され、抗体はさらに、(切断可能な)結合を介して少なくとも1つのエフェクター部分「E」と複合体を形成する(共有結合される)。サポニンは通常、リガンド、ここでは抗体におけるシステインの-SH基に連結される。1つ又は複数のエフェクター部分は通常、リガンド、ここでは抗体におけるシステインの-SH基に連結される。通常、少なくとも1つのサポニンは、SA1641、SO1861、GE1741、QS-21、QS-7、又はその誘導体、及びその組み合わせから選択され、サポニンSO1861(誘導体)が好ましい。本発明のコンジュゲートにおける組み込みのために選択される典型的な細胞表面分子標的化リガンドは、トラスツズマブ、セツキシマブ、抗CD71モノクローナル抗体、又はEGFRに結合するためのEGFなどの(腫瘍)細胞表面受容体に特異的な免疫グロブリンである。図1Fにおいて、細胞標的化リガンドは、細胞表面受容体に特異的な抗体である。典型的な標的化される細胞表面分子は、HER2、EGFR、CD20、CD22、葉酸受容体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L、PSMA、CanAg、インテグリンアルファV、CA6、CD33、メソセリン、Crypt o、CD3、CD30、CD33、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、エフリンA4、MUC1、Trop2、CD38、FGFR3、CD123、DLL3、CEACAM5、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD71である。既知の腫瘍標的化抗体もまた、図1Fによる本発明のコンジュゲートを製造するのに好ましい。通常、1つ又は複数のエフェクター部分は、ジアンチン、サポリン、リボソーム不活性化タンパク質などの(タンパク質)毒素から選択されるか、又はRNA、siRNA、mRNA、BNAなどのオリゴヌクレオチド、又は酵素である。サポニン及びペイロード(エフェクター部分)は、抗体に共有結合的に直接的にカップリングされるか又は4.5~5.5のpHなどの酸性条件下で切断可能な、切断可能なリンカーなどのリンカーを介して抗体に連結される。

【0243】

本発明者らによって製造され、活性について試験される図1Fのエンドソーム／リソソーム脱出強化コンジュゲートの例は少なくとも、(末端)SO1861にカップリングされ及びHSP27サイレンシングASO(BNA)、ジアンチン、酵素Cre-リコンビナーゼなどのペイロードにカップリングされたセツキシマブ、抗CD71モノクローナル抗体、及びトラスツズマブである。本発明に関連して用語「末端」は、本発明のコンジュゲートにおける単一のさらなる分子に共有結合的に連結される分子として理解されることになる。例えば、コンジュゲートサポニン-sdAb-エフェクター部分において、サポニン及びエフェクター部分の両方は、コンジュゲートにおける末端部分である一方で、sdAbは、2つの末端部分を有する中心的な部分である。

【0244】

図1Gは、デンドロン又はPAMAMなどの足場部分を介してIgGなどの標的化リガンドと複合体を形成した少なくとも1つのサポニン部分「S」を含む本発明によるエンドソーム／リソソーム脱出強化コンジュゲートを表す模式図であり、サポニンは、デンドロンに直接的に、又は(切断可能な)リンカーを介して連結される。1つ又は複数のデンドロン部分は通常、リガンド(抗体)におけるシステインの-SH基に連結される。通常、サポニンは、SA1641、SO1861、GE1741、QS-21、QS-7並びにその組み合わせ及びその誘導体から選択され、サポニンSO1861(誘導体)が好ましい。本発明のコンジュゲートにおける組み込みのために選択される典型的な細胞表面分子標的化リガンドは、トラスツズマブ、抗CD71モノクローナル抗体、セツキシマブなどの(腫瘍)細胞表面受容体に特異的な免疫グロブリンである。当技術分野で知られる抗腫瘍モノクローナル抗体もまた、図1Gによる本発明のコンジュゲートを製造するのに好ましい。コンジュゲートは、少なくとも1つのエフェクター部分「E」とさらに複合体を形成した抗体を含み、1つ又は複数のエフェクター部分は、少なくとも1つのサポニン部分がカップリングされるデンドロンなどの同じ足場に連結され、エフェクター部分は、リンカーなどの(切断可能な)結合を介してデンドロンにカップリングされる。通常、抗体は、細胞表面分子はHER2、EGFR、CD20、CD22、葉酸受容体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L、PSMA、CanAg、インテグリンアルファV、CA6、CD33、メソセリン、CripTo、CD3、CD30、CD33、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、エフリンA4、MUC1、Trop2、CD38、FGFR3、CD123、DLL3、CEACAM5、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD71のいずれかに結合する。

【0245】

本発明者らによって製造され、活性について試験される図1Gのエンドソーム／リソソーム脱出強化コンジュゲートの例は、少なくとも1つのデンドロンとともに提供される少なくともトラスツズマブであり、その少なくとも1つのデンドロンは、1つ又は複数の(末端)サポニン部分及び1つ又は複数の(末端)ペイロード部分(1つ又は複数のエフェクター部分)に結合される。サポニンは通常、SO1861であり、ペイロードは通常、HSP27(ASO(BNA))、又は(タンパク質)毒素若しくはsiRNAをサイレンシングすることができるBNAである。SO1861(誘導体)は、切断可能なヒドラゾン結合(共有結合)を介してデンドロンにカップリングされる。

【0246】

実施例5

SO1861は、(不安定な)システイン残基(Cys)を介してコンジュゲートされ、ジアンチン(タンパク質毒素)は、(安定な)リジン残基(Lys)を介してセツキシマブ(ヒトEGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体)にコンジュゲートされて、セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,9}(Lys-S-ジアンチン)²をもたらした。コンジュゲートは、図1Jにおいて示されるとおりのEGFR腫瘍標的化細胞死滅に関してA431(EGFR⁺⁺)異種移植マウス腫瘍モデルにおいて試験された。投与は腫瘍のサイズが約150mm³に達した12日目に開始され、腫瘍体積は各投与の後

10

20

30

40

50

に測定された。マウス ($n=3$) は、12日目: 0.5 mg/kg ; 15日目: 1 mg/kg 及び 24日目: 1.5 mg/kg にセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-S-ジアンチン)² 又はセツキシマブー (Lys-S-ジアンチン)^{1,6} で治療された (腹腔内; i.p.; 用量漸増)。26日目に、対照群と比較して、腫瘍体積の縮小は、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-S-ジアンチン)² で治療された担腫瘍マウスにおいて観察された (図8A)。これは、抗体-タンパク質毒素 (安定な) コンジュゲートに対するSO1861の不安定なコンジュゲーションが、腫瘍標的化抗体-タンパク質毒素の標的化される治療有効性を強化することによって、より効果的な腫瘍標的化療法を誘導することを示す。

【0247】

次に、SO1861は、(不安定な) システイン残基 (Cys) を介してコンジュゲートされ、ジアンチン (タンパク質毒素) は、(不安定な) リジン残基 (Lys) を介してセツキシマブ (ヒトEGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体) にコンジュゲートされて、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-ジアンチン)² をもたらした。コンジュゲートは、図1Jにおいて示されるとおりのEGFR腫瘍標的化細胞死滅に関してA431 (EGFR⁺⁺) 異種移植マウス腫瘍モデルにおいて試験された。投与は腫瘍のサイズが約 150 mm^3 に達した12日目に開始され、腫瘍体積は各投与の後に測定された。マウス ($n=3$) は、12日目: 0.5 mg/kg ; 15日目: 1 mg/kg ; 24日目: 1.5 mg/kg にセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-ジアンチン)² 又はセツキシマブー (Lys-L-ジアンチン)^{1,6} で治療された (腹腔内; i.p.; 用量漸増)。これは、35日後に、対照と比較して、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-ジアンチン)² で治療された担腫瘍マウスが、腫瘍増殖の阻害を示したことを明らかにした (図8B)。マウス ($n=3$) が、12日目: 0.5 mg/kg ; 15日目: 1 mg/kg ; 18日目: 2 mg/kg ; 24日目: 2.5 mg/kg に本発明によるセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-ジアンチン)² で治療されたとき (静脈内、i.v.; 用量漸増)、腫瘍増殖の阻害もまた、対照と比較して観察された (2頭のマウスが治療中に死亡したため、データは、1頭のマウスを表す)。これは、抗体-タンパク質毒素 (不安定な) コンジュゲートに対するSO1861の不安定なコンジュゲーションが、腫瘍標的化抗体-タンパク質毒素の標的化される治療有効性を強化することによって、サポニンを含まない抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートと比較してより効果的な腫瘍標的化療法を誘導することを示す。

【0248】

次に、SO1861-EMCHを、システイン残基 (Cys) を介してDAR 3.9でセツキシマブ (ヒトEGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体) に、及びアンチセンスHSP27BNAオリゴヌクレオチド (癌細胞における腫瘍標的 hsp27 mRNAの分解を標的化し、誘導する (遺伝子サイレンシング)) を不安定な (L) リンカーを介してDAR 1.8で抗体のリジン残基 (Lys) にコンジュゲートして、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-HSP27BNA)^{1,8} の生成をもたらした。セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-HSP27BNA)^{1,8} は、図1Kに示されるとおりの本発明によるEGFR媒介性腫瘍標的化HSP27遺伝子サイレンシングのためのA431異種移植「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて試験された。投与は腫瘍のサイズが約 150 mm^3 に達した12日目に開始され、HSP27 mRNA発現が決定された。これに関して、腫瘍試料は、最初の投与後の72時間目に回収され、細胞性対照mRNA発現レベル (参照遺伝子) と比較してHSP27遺伝子発現レベルについて分析された。 30 mg/kg セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,9} (Lys-L-HSP27BNA)^{1,8} で治療された (腹腔内; i.p.) 担腫瘍マウス ($n=3$) は、1回の投与後に、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,8} 又はセツキシマブー (Lys-L-HSP27BNA)^{1,5} の単回投与と比較して腫瘍においてHSP27 mRNA発現の40%の低下を示した (図

10

20

30

40

50

9)。溶媒対照の腫瘍と比較して、25% HSP27遺伝子発現の低下が観察された。これは、本発明によるSO1861及びHSP27BNAの同じ標的化抗体へのコンジュゲーションが、担腫瘍マウスの固形腫瘍における治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドのSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にしている。

【0249】

別の例において、三官能性リンカー足場は、一方のアーム上でのSO1861及び他方のアーム上のHSP27BNAによるコンジュゲーションのための3つの特定の化学末端基を伴って設計され、生成されて、SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNAを生成した。次に、SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNAは、その第3のアームにより抗EGFR抗体、セツキシマブ（セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-HSP27BNA)^{3,7}）のシステイン残基（Cys）にコンジュゲートされ、図1Lに示されるとおりの本発明によるEGFR媒介性の腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシング活性に関してA431異種移植「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて試験された。投与は腫瘍のサイズが約150mm³に達した12日目開始され、HSP27 mRNA発現が決定された。これに関して、腫瘍試料は、最初の投与後の72時間目に回収され、細胞性対照mRNA発現レベル（参照遺伝子）と比較してHSP27遺伝子発現レベルについて分析された。これは、30mg/kg セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}の1回の投与が、25mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,8}又は25mg/kg セツキシマブ-(Lys-L-HSP27BNA)⁴単剤療法の単回投与と比較して腫瘍においてHSP27遺伝子発現の40%の低下をもたらしたことを明らかにした（図10）。溶媒対照腫瘍と比較して、25% HSP27遺伝子発現の低下は、セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}の1回の投与で治療された担腫瘍マウスにおいて観察された。これは、セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}が、担腫瘍マウスの固形腫瘍における治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドのSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、インビボで標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にする。

【0250】

実施例6

本発明による別の例において、SO1861（不安定）及びタンパク質毒素、ジアンチン（不安定又は安定）は、HER2標的化抗体、トラスツズマブにコンジュゲートされた。トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,8}（Lys-L-ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,9}（Lys-S-ジアンチン）^{2,0}が生成され、図1Jに示されるとおりのSK-BR-3（HER2⁺⁺）及びMDA-MB-468（HER2⁻）において細胞死滅の亢進について試験された。トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,8}（Lys-L-ジアンチン）^{1,7}（IC50=0.8nM）及びトラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,9}（Lys-S-ジアンチン）^{2,0}（IC50=0.8nM）の両方が、SK-BR-3細胞（HER2⁺⁺）の細胞死滅を効率的に誘導する（図11A）。これは、トラスツズマブ、トラスツズマブ-(Lys-L-ジアンチン）^{1,7}、トラスツズマブ-(Lys-S-ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ-(L-SO1861)^{3,8}単独で治療されたSK-BR-3細胞において観察されなかった（図11A）。MDA-MB-468細胞（HER2⁻）において、細胞死滅活性は、本発明によるコンジュゲートのいずれかについて観察され得ない（図11B）。これは、HER標的化抗体-タンパク質毒素コンジュゲートへのSO1861のコンジュゲーションが、標的細胞においてタンパク質毒素のSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、標的細胞の死をもたらすことを示す。

【0251】

本発明による別の例において、SO1861（不安定）及びタンパク質毒素、ジアンチ

ン（不安定又は安定）は、EGFR標的化抗体、セツキシマブにコンジュゲートされた。セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 9}（Lys-L-ジアンチン）²又はセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 9}（Lys-S-ジアンチン）²は、図1Jに示されるとおりのA431（HER2⁺⁺）及びA2058（HER2⁻）において細胞死滅の亢進について試験された。セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 9}（Lys-L-ジアンチン）²（IC50=0.3 nM）及びセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-S-ジアンチン）^{1, 7}（IC50=0.3 nM）の両方が、セツキシマブー（Lys-L-ジアンチン）^{1, 6}（IC50=2 pM）、セツキシマブー（Lys-S-ジアンチン）^{1, 6}（IC50=2 pM）単独と比較してA431細胞（EGFR⁺⁺）において細胞死滅の亢進を示した（図11C）。A2058細胞（EGFR⁻）において、本発明による組み合わせは、いずれの細胞死滅活性も示さなかった（IC50>200 nM；図11D）。これは、EGFR標的化抗体-タンパク質毒素コンジュゲートへのSO1861のコンジュゲーションが、標的細胞においてタンパク質毒素のSO1861媒介性の細胞質内送達を効率的に強化して、標的細胞の死の亢進をもたらすことを示す。

【0252】

実施例7

本発明による別の例において、SO1861（不安定）及びHSP27BNAオリゴヌクレオチド（不安定、L）は、EGFR標的化抗体、セツキシマブにコンジュゲートされた。セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 8}は、図1Kに示されるとおりの本発明によるA431細胞（EGFR⁺⁺）及びA2058（EGFR⁻）細胞においてHSP27遺伝子サイレンシングの強化について試験された。セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 8}は、セツキシマブ、セツキシマブー（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 9}又はセツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}単独と比較してA431細胞（IC50=3 nM）においてHSP27遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（図12A）。A2058細胞（EGFR⁻）において、遺伝子サイレンシング活性は、セツキシマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 8}で観察され得ない（IC50>100 nM；図12B）。これは、本発明によるSO1861及びHSP27BNAの同じ標的化抗体へのコンジュゲーションが、標的細胞における治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドのSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にする。

【0253】

本発明による別の例において、SO1861（不安定）及びHSP27BNAオリゴ（不安定）は、HER2標的化抗体、トラスツズマブにコンジュゲートされた。トラスツズマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 5}は、図1Kに示されるとおりの本発明によるSK-BR-3細胞（HER2⁺⁺）細胞においてHSP27遺伝子サイレンシングの強化について試験された。トラスツズマブー（Cys-L-SO1861）^{3, 8}（Lys-L-HSP27BNA）^{3, 5}は、トラスツズマブー（Lys-L-HSP27BNA）^{4, 4}単独と比較してSK-BR-3細胞（IC50=9 nM）においてHSP27遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（図13）。これは、本発明によるSO1861及びHSP27BNAのHER2標的化抗体へのコンジュゲーションが、標的細胞における治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドのSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にする。

【0254】

別の例において、セツキシマブーCys-（SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA）^{3, 7}は、図1Lに示されるとおりの本発明によるA431細胞（EGFR⁺⁺）及びA2058（EGFR⁻）細胞においてHSP27遺伝子サイレンシング

10

20

30

40

50

の強化について試験された。セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}は、セツキシマブ-(Lys-L-HSP27BNA)⁴又はセツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,7}単独と比較してA431細胞(IC50=2 nM)においてHSP27遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する(図14A)。A2058細胞(EGFR⁻)において、遺伝子サイレンシング活性は、高濃度(>80 nM)のセツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}でのみ観察された(IC50=100 nM; 図14B)。これは、高EGFR発現細胞において、セツキシマブ-Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー-L-HSP27BNA)^{3,7}が、標的細胞において治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドのSO1861媒介性の強化された細胞質内送達を効率的に誘導して、標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にする。

10

【0255】

タンパク質毒素又はサポニンに共有結合された抗体及び受容体リガンドに関連するいくつかの実施形態の概要

mAb: トラスツズマブ(HER2)又はセツキシマブ(EGFR)

リガンド: EGF

タンパク質毒素: リボソーム不活性化タンパク質、サポリン又はジアンチン

リガンドを伴うサポニンのエンドソーム脱出強化コンジュゲート:

mAb-SO1861エンドソーム脱出強化コンジュゲート

- ・切断可能なヒドラゾンリンカーを含有する
- ・トラスツズマブ-SO1861 DAR 4.0
- ・セツキシマブ-SO1861 DAR 3.7;

20

以下によるインビトロ又はインビボ試験モデルで組み合わせられたリガンドとサポニンのエンドソーム脱出強化コンジュゲート:

mAb/リガンド-タンパク質毒素コンジュゲート

- ・切断不可能な化学的リンカーを含有するか又は組換え融合タンパク質である
- ・トラスツズマブ-サポリン DAR 3.0
- ・セツキシマブ-サポリン DAR 2.6
- ・トラスツズマブ-ジアンチン DAR 1.0
- ・EGF-ジアンチン(融合タンパク質) DAR 1.0
- ・IgG-サポリン DAR 2.2

30

【0256】

実施例8~13に関して:

材料:

トラスツズマブ及びセツキシマブは、薬局(Charite, Berlin)から購入された。SO1861は、サポナリア・オフィキナリス L(Saponaria officinalis L)から得られる生の植物抽出物からAnalyticon Discovery GmbHによって単離され、精製された。

【0257】

方法

40

SO1861-EMCH合成

SO1861は、サポナリア・オフィキナリス L(Saponaria officinalis L)(Analyticon Discovery GmbH)からのものであり、当技術分野で知られる従来の工程に従ってEMCHにカップリングされた。

【0258】

SO1861の抗体へのコンジュゲーション

トラスツズマブ-SO1861及びセツキシマブ-SO1861の注文生産は、Fleet Bioprocessing(UK)によって実施された。SO1861-EMCHは、抗体のシステインにコンジュゲートされた。

【0259】

50

サポリンのトラスツズマブ及びセツキシマブへのコンジュゲーション

注文のトラスツズマブーサポリン及びセツキシマブーサポリンコンジュゲートが製造され、Advanced Targeting Systems (San Diego, CA) から購入された。IgGーサポリン及びサポリンは、Advanced Targeting Systemsから購入された。

【0260】

FACS分析

FACS分析は、BD FACSCanto II、FlowJo V10ソフトウェアによるデータ分析に対して実施され、FACS抗体は、1) アイソタイプ：APCマウスIgG1、 κ アイソタイプCtrl (FC) (400122、Biolegend) であ

10

った。EGFR：APC抗ヒトEGFR (352906、Biolegend) HER2：APC抗ヒトCD340 (erbB2/HER-2) (324408、Biolegend)。

【0261】

ジアンチン生成

ジアンチンは、細菌培養物において発現され、タンパク質は、当技術分野で知られる従来の細胞培養及びタンパク質精製工程に従って精製された。

【0262】

抗体のジアンチンへのコンジュゲーション

抗体及びジアンチンのコンジュゲーションは、当技術分野で知られる一般的な手順に従う。

20

【0263】

細胞培養

細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FBS) (PAN-Biotech GmbH) が補充されたDMEM (PAN-Biotech GmbH) 中において37℃及び5% CO₂で培養された。

【0264】

細胞生存率アッセイ

細胞を、100 μ L / ウェル中において5,000~10,000 c/wで96ウェルプレートに播種し、37℃で一晩インキュベートした。翌日、10倍濃縮された処理混合物試料を、PBS中で調製し、これは、両方ともに10×最終濃度で抗体にコンジュゲートされたSO1861 (すなわち、本発明の「結合分子」又は「エンドソーム脱出強化コンジュゲート」) 及び標的化毒素 (すなわち、「結合分子」) を含有する。培地を、細胞培養プレートから除去し、180 μ Lの培養培地によって置き換えた後、20 μ Lの処理混合物 / ウェルを加えた。対照に関して、対応する濃度の抗体にコンジュゲートされたSO1861のみ、抗体のみ、SO1861のみ、標的化毒素のみ、又は溶媒対照として化合物を伴わないPBSを含有した10×処理混合物試料を調製した。エンドソーム酸性化阻害剤 (クロロキン (Sigma Aldrich) 又はバフィロマイシンA1 (Enzo Life Sciences)) が使用された場合、処理の工程1における細胞培養培地を、1 μ M クロロキン又は0.2 μ M バフィロマイシンA1を含有する180 μ Lの培地によって置き換えた。プレートを、37℃で1時間インキュベートした後、10×処理混合物試料を加えた。残りのインキュベーション及び処理工程を、当技術分野で知られる標準的な手順に従って実施した。

30

40

【0265】

処理の後、細胞を37℃で72時間インキュベートした後、細胞生存率を、製造業者の指示書 (CellTiter 96 (登録商標) Aqueous一溶液細胞増殖アッセイ、Promega) に従って実施されるMTSーアッセイによって決定した。簡潔には、MTS溶液を、10% FBS (PAN-Biotech GmbH) で補充されたフェノールレッド (PAN-Biotech GmbH) を伴わないDMEM中で20倍希釈した。細胞を、ウェル当たり200 μ LのPBSで1回洗浄した後、100 μ Lの希釈され

50

たMTS溶液をウェル毎に加えた。プレートを、37℃でおよそ20～30分間インキュベートした。その後、492nmでの光学密度を、Thermo Scientific Multiskan FCプレートリーダー（Thermo Scientific）上で測定した。定量化のために、「培地のみ」のウェルのバックグラウンドシグナルを、全ての他のウェルから減算した後、未処理／処理細胞の比率を、未処理のウェルのバックグラウンド補正シグナルを処理されたウェルのバックグラウンド補正シグナルで割ることによって計算した。

【0266】

結果

実施例8. 1標的2-構成成分系

1標的2-構成成分系は、mAb1-タンパク質毒素及びmAb1-SO1861の組み合わせ治療である一方で（図1A、Eを参照のこと）、2標的2-構成成分系は、mAb-タンパク質毒素及びmAb2-SO1861又はmAb2-タンパク質毒素+mAb1-SO1861の組み合わせである（図1B～D）。本発明の1-標的1構成成分系（IgGなどの抗体又はV_{HH}などのsdAbなどの同じリガンドが、サポニンを前記リガンドの第1の部分に共有結合的にコンジュゲートするため及びエフェクター分子を前記リガンドの第2の別々の部分に共有結合的にコンジュゲートするために適用される）は、例えば、mAb1-SO1861及びmAb1-エフェクター部分を含む（図1F～Lを参照のこと）。

【0267】

セツキシマブ-SO1861（サポニン分子、SO1861にコンジュゲートされた、EGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体；エンドソーム脱出強化コンジュゲート）を、10pMのセツキシマブ-サポリン（タンパク質毒素、サポリンにコンジュゲートされた、EGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体）の固定された濃度に対して滴定し（SO1861濃度に対して計算される）、高EGFR発現細胞に対する細胞死滅を決定した。高EGFR発現細胞（A431又はCaSKi）は、10pMのセツキシマブ-サポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたとき、効率的な細胞死滅を示した（A431：[SO1861] IC₅₀=600nM及びCaSKi：[SO1861] IC₅₀=700nM；図15A、15B；表A6）。しかしながら、セツキシマブ-サポリンがセツキシマブ-SO1861と組み合わせられたとき、低濃度のSO1861で既に強力な細胞死滅が誘導された（A431：[SO1861] IC₅₀=5nM及びCaSKi [SO1861] IC₅₀=8nM；図15A、15B；表A6）。これは、標的化コンジュゲートSO1861が、非標的化非コンジュゲートSO1861と比較してエンドソーム脱出を誘導する際により効果的であることを示す。次に、セツキシマブ-サポリンを、300nMのセツキシマブ-SO1861の固定された濃度に対して滴定し、EGFR発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。高EGFR発現細胞（A431又はCaSKi）は、非標的化非コンジュゲートの300nM SO1861と組み合わせた高いセツキシマブ-サポリン濃度でのみ細胞死滅を示す一方で（A431：[毒素] IC₅₀=40pM；CaSKi：[毒素] IC₅₀=40pM；図15C、15D；図A7）、低いセツキシマブ-サポリン濃度と組み合わせた300nMのセツキシマブ-SO1861で既に、効率的な細胞死滅を誘導した（A431：[毒素] IC₅₀=0.4pM；CaSKi：[毒素] IC₅₀=2pM；図15C及び15D；表A7）。最も高い細胞死滅効率は、高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861（1500nM）が低濃度のセツキシマブ-サポリンと組み合わせられるときに達成される（A431：[毒素] IC₅₀=0.03pM；CaSKi：[毒素] IC₅₀=0.02pM；図15C、15D；表A7）。このことは、セツキシマブにコンジュゲートされるとき、相対的に低い濃度のSO1861が、相対的に低い濃度のセツキシマブ-サポリンと組み合わせると高EGFR発現細胞を効率的に死滅させることができることを示す。低濃度のセツキシマブ-サポリンと組み合わせた高濃度（1500nM）の非標的化非コンジュゲートSO1861は、1標的2-構成成

10

20

30

40

50

分系において両方のコンジュゲートが同じEGFR受容体について競合するので、受容体競合がSO1861の細胞への進入に役割を果たさないため、依然として最も効果的である。受容体競合原理はまた、セツキシマブを伴わないか（A431：[毒素] IC50 = 40 pM；Caski：[毒素] IC50 = 40 pM）又は75 nM セツキシマブを伴う（A431：[毒素] IC50 = 1000 pM；Caski：IC50 = 1000 pM；図15C、15D）セツキシマブー毒素滴定処理においても明確に示される。

【0268】

次に、セツキシマブーSO1861を、10 pM セツキシマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し（SO1861の濃度に対して計算される）、低／無EGFR発現細胞に対する細胞死滅を決定した。低EGFR発現細胞（HeLa）は、10 pM セツキシマブーサポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたときのみ細胞死滅を示した一方で、EGFRを発現しないA2058細胞（A2058）は全く感受性がなかった（HeLa：[SO1861] IC50 = 1000 nM；A2058：[SO1861] IC50 > 1000 nM；図16A、16B；表A6）。10 pM セツキシマブーサポリンと増加した濃度のセツキシマブーSO1861の組み合わせは、両方の細胞株においていずれの著しい細胞死滅も誘導しなかった（HeLa：[SO1861] IC50 = 1000 nM；A2058：[SO1861] IC50 > 1000 nM；図16A、16B；表A6）。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内SO1861濃度が、エンドソームタンパク質毒素脱出及び毒素媒介性の細胞死滅を誘導するための（閾値）に達しないことを示す。次に、セツキシマブーサポリンを、300 nMのセツキシマブーSO1861の固定された濃度に対して滴定し、低／無EGFR発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。低EGFR発現細胞（HeLa）は、278 nMのセツキシマブーSO1861又は300 nMの非コンジュゲートSO1861と組み合わせた非常に高いセツキシマブーサポリン濃度でのみ細胞死滅を示す一方で、A2058細胞（EGFR）は、いずれの試験濃度でも感受性ではない（HeLa：[毒素] IC50 = 60 pM；A2058：[毒素] IC50 > 10,000 pM；図16C、16D；表A7）。低EGFR発現細胞（HeLa）における低濃度のセツキシマブーサポリンと組み合わせた高濃度の非コンジュゲートSO1861（1500 nM）は、効率的な細胞死滅を示す一方で、A2058細胞において、標的化されない1500 nM SO1861と組み合わせた非常に高いセツキシマブーサポリン濃度でのみ非特異的な細胞死滅が誘導される（HeLa：[毒素] IC50 = 0.03 pM；A2058：[毒素] IC50 = 20 pM；図16C、16D；表A5）。このことは、低いEGFR受容体発現を有するか又はEGFR受容体発現を有しない細胞が、細胞内の十分なSO1861及び毒素の進入を促進する十分なEGFR受容体の欠如に起因して、セツキシマブーSO1861＋セツキシマブーサポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

【0269】

トラスツズマブーSO1861（サポニン分子、SO1861にコンジュゲートされた、HER2を認識し、結合するモノクローナル抗体；本発明によるエンドソーム脱出強化コンジュゲート）を、50 pMのトラスツズマブーサポリン（タンパク質毒素、サポリンにコンジュゲートされた、HER2を認識し、結合するモノクローナル抗体）の固定された濃度に対して滴定し（SO1861濃度に対して計算される）、高HER2発現細胞に対する細胞死滅を決定した。高HER2発現細胞（SKBR3）は、50 pMのトラスツズマブーサポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたとき、効率的な細胞死滅を示した（SKBR3；図17A、17B；表A6）。しかしながら、トラスツズマブーサポリンがトラスツズマブーSO1861と組み合わせられたとき、強力な細胞死滅が、低濃度のSO1861で既に誘導された（SKBR3；図17A、17B；表A6）。これは、標的化コンジュゲートSO1861が、非標的化非コンジュゲートSO1861と比較してエンドソーム脱出を誘導する際により効果的であることを示す。次に、トラスツズマブーサポリンを、50 nMのトラスツズマブーSO1861

の固定された濃度に対して滴定し、HER2発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。高HER2発現細胞（SKBR3又はBT474）は、非標的化非コンジュゲートの10 nM SO1861と組み合わせた高トラスツズマブーサポリン濃度でのみ細胞死滅を示す一方で（表A7）、低トラスツズマブーサポリン濃度と組み合わせた10 nM トラスツズマブーSO1861で既に、効率的な細胞死滅を誘導した（表A7）。最も高い細胞死滅効率は、高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861（1500 nM）が低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせられるときに達成される（表A7）。このことは、トラスツズマブにコンジュゲートされるとき、低い濃度のSO1861が、相対的に低い濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせると高HER2発現細胞を効率的に死滅させることができることを示す。低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせた高濃度（1500 nM）の非標的化非コンジュゲートSO1861は、1標的2-構成成分系において両方のコンジュゲートが同じEGFR受容体について競合するので、受容体競合がSO1861の細胞への進入に役割を果たさないため、依然として最も効果的である。受容体競合原理はまた、2.5 nMのトラスツズマブを伴わないか又は伴うトラスツズマブー毒素滴定処理においても明確に示される（SKBR3：[毒素] IC50 = 1000 nM）。

【0270】

次に、トラスツズマブーSO1861を、50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し（SO1861の濃度に対して計算される）、低／無EGFR発現細胞に対する細胞死滅を決定した。低EGFR発現細胞（JIMT1；A431）は、50 pMのトラスツズマブーサポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたとき、細胞死滅をわずかに示した（JIMT1：[SO1861] IC50 > 1000 nM；A431：[SO1861] IC50 > 1000 nM；図18A、18B；表A6）。50 pM トラスツズマブーサポリンと増加した濃度のトラスツズマブーSO1861の組み合わせは、両方の細胞株においていずれの著しい細胞死滅も誘導しなかった（JIMT1：[SO1861] IC50 > 1000 nM；A431：[SO1861] IC50 > 1000 nM；図18A、18B；表A6）。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内SO1861濃度が、エンドソームタンパク質毒素脱出及び毒素媒介性の細胞死滅を誘導するための（閾値）に達しないことを示す。次に、トラスツズマブーサポリンを、10 nMのトラスツズマブーSO1861の固定された濃度に対して滴定し、低／無HER2発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。低HER2発現細胞（JIMT1；A431）は、10 nM トラスツズマブーSO1861と組み合わせた高トラスツズマブーサポリン濃度で著しい細胞死滅を示さない（JIMT1：[毒素] IC50 > 10,000 pM；A431：[毒素] IC50 > 10,000 pM；図18C、18D；表A7）。低HER2発現細胞における低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせた高濃度の非コンジュゲートSO1861（1500 nM）は、効率的な細胞死滅を示す（JIMT1：[毒素] IC50 = 0.1 pM；A431：[毒素] IC50 = 0.8 pM；図18C、18D；表A5）。このことは、低HER2受容体発現を有する細胞が、細胞内の十分なSO1861及び毒素の進入を促進する十分なEGFR受容体の欠如に起因して、トラスツズマブーSO1861+トラスツズマブーサポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

【0271】

実施例9. 2標的2-構成成分系

セツキシマブーSO1861を、50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し（SO1861の濃度に対して計算される）、高EGFR／低HER2発現細胞に対する細胞死滅を決定した。A431及びCaski細胞は、50 pMのトラスツズマブーサポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたとき、効率的な細胞死滅を示した（A431及びCaski：[SO1861] IC50 = 1000 nM；図19A、19B；表A6）。しかしながら、トラスツズマブーサポリンがセツキシマブーSO1861と組み合わせられたとき、低濃度のSO1861で

既に強力な細胞死滅が誘導された (A 4 3 1 : [S O 1 8 6 1] I C 5 0 = 1 2 n M 及び C a s k i [S O 1 8 6 1] I C 5 0 = 4 0 n M ; 図 1 9 A、1 9 B ; 表 A 6)。これは、標的化コンジュゲート S O 1 8 6 1 が、非標的化非コンジュゲート S O 1 8 6 1 と比較してエンドソーム脱出を誘導する際により効果的であることを示す。次に、トラスツズマブーサポリンを、3 0 0 n M のセツキシマブー S O 1 8 6 1 の固定された濃度に対して滴定し、高 E G F R / 低 H E R 2 発現細胞 (A 4 3 1 及び C a s k i) に対して標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。非標的化非コンジュゲートの 3 0 0 n M S O 1 8 6 1 と組み合わせた高トラスツズマブーサポリン濃度により効果的な細胞死滅は観察されなかった一方で (A 4 3 1 及び C a s k i : [毒素] I C 5 0 > 1 0 , 0 0 0 p M ; 図 1 9 C、1 9 D ; 図 A 7)、低いトラスツズマブーサポリン濃度と組み合わせた 3 0 0 n M のセツキシマブー S O 1 8 6 1 で既に、効率的な細胞死滅を誘導した (A 4 3 1 : [毒素] I C 5 0 = 3 p M ; C a s k i : [毒素] I C 5 0 = 1 p M ; 図 1 9 C 及び 1 9 D ; 表 A 7)。A 4 3 1 細胞において、同等の細胞死滅効率は、高濃度 (1 5 0 0 n M) の非標的化非コンジュゲート S O 1 8 6 1 が低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせられるときに達成される (A 4 3 1 : [毒素] I C 5 0 = 1 p M ; 図 1 9 C ; 表 A 7 を参照のこと)。C a s k i 細胞において、応答は、これらの細胞における E G F R 発現が A 4 3 1 と比較して著しく低く、したがって、S O 1 8 6 1 の C a s k i 細胞への標的化された送達が不十分であるという事実に起因して、セツキシマブー S O 1 8 6 1 及びトラスツズマブーサポリンの組み合わせと比較してわずかに強力であった (C a s k i : [毒素] I C 5 0 = 0 . 2 p M ; 図 1 9 D ; 表 A 7 を参照のこと)。このことは、セツキシマブにコンジュゲートされるとき、低濃度の S O 1 8 6 1 が、相対的に低い濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせて高 E G F R 発現細胞を効率的に死滅させることができることを示す。低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせた高濃度 (1 5 0 0 n M) の非標的化非コンジュゲート S O 1 8 6 1 は、2 - 標的 2 - 構成成分系において両方のコンジュゲートが異なる受容体を介して、E G F R を介して S O 1 8 6 1 及び H E R 2 受容体を介して毒素が送達されるので、受容体競合が S O 1 8 6 1 の細胞への進入に役割を果たさないため、同等の活性を有する。

【 0 2 7 2 】

次に、セツキシマブー S O 1 8 6 1 を、5 0 p M トラスツズマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し (S O 1 8 6 1 の濃度に対して計算される)、低 / 無 E G F R / H E R 2 発現細胞に対する細胞死滅を決定した。低 E G F R / H E R 2 発現細胞は、5 0 p M のトラスツズマブーサポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲート S O 1 8 6 1 と組み合わせられたとき、細胞死滅をわずかに示した (H e L a : [S O 1 8 6 1] I C 5 0 > 1 0 0 0 n M ; A 2 0 5 8 : [S O 1 8 6 1] I C 5 0 > 1 0 0 0 n M ; 図 2 0 A、2 0 B ; 表 A 6)。5 0 p M トラスツズマブーサポリンと増加した濃度のセツキシマブー S O 1 8 6 1 の組み合わせのみが、両方の細胞株において高濃度のセツキシマブー S O 1 8 6 1 で著しい細胞死滅を示した (H e L a : [S O 1 8 6 1] I C 5 0 > 1 0 0 0 n M ; A 2 0 5 8 : [S O 1 8 6 1] I C 5 0 > 1 0 0 0 n M ; 図 2 0 A、2 0 B ; 表 A 6)。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内 S O 1 8 6 1 濃度が、エンドソームタンパク質毒素脱出及び毒素媒介性の細胞死滅を誘導するための (閾値) に達しないことを示す。次に、トラスツズマブーサポリンを、セツキシマブー S O 1 8 6 1 の固定された濃度に対して滴定し、低 / 無 E G F R / H E R 2 発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。低 / 無 E G F R / H E R 2 発現細胞 (H e L a 及び A 2 0 5 8) は、2 7 8 n M セツキシマブー S O 1 8 6 1 と組み合わせた高トラスツズマブーサポリン濃度で著しい細胞死滅を示さない (H e L a : [毒素] I C 5 0 > 1 0 , 0 0 0 p M ; A 2 0 5 8 : [毒素] I C 5 0 > 1 0 , 0 0 0 p M ; 図 2 0 C、2 0 D ; 表 A 7)。低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせた高濃度の非コンジュゲート S O 1 8 6 1 (1 5 0 0 n M) は、効率的な細胞死滅を示す (H e L a : [毒素] I C 5 0 = 0 . 4 p M ; A 2 0 5 8 : [毒素] I C 5 0 = 0 . 5 p M ; 図 2 0 C、2 0 D ; 表 A 5)。このことは、低 / 無 E G F R / 低 H E R 2 発現を有する細胞が、細胞内の毒素

10

20

30

40

50

の効率的な細胞質内送達を確実にする十分なSO1861の進入を促進する十分なEGFR受容体の欠如に起因して、セツキシマブ-SO1861+トラスツズマブ-サポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

【0273】

次に、トラスツズマブ-SO1861を、1.5 pM EGF-ジアンチンの固定された濃度に対して滴定し（SO1861の濃度に対して計算される）、高HER2/低EGFR発現細胞に対する細胞死滅を決定した。SKBR3は、1.5 pMのEGF-ジアンチンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたとき、効率的な細胞死滅を示した（SKBR3: [SO1861] IC50=800 nM; 図21A; 表A6）。しかしながら、EGF-ジアンチンがトラスツズマブ-SO1861と組み合わせられたとき、低濃度のコンジュゲートされたSO1861で既に強力な細胞死滅が誘導された（SKBR3: [SO1861] IC50=2 nM; 図21A; 表A6）。これは、標的化コンジュゲートSO1861が、非標的化非コンジュゲートSO1861と比較してエンドソーム脱出を誘導する際により効果的であることを示す。次に、EGF-ジアンチンを、トラスツズマブ-SO1861の固定された濃度に対して滴定し、標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅をSKBR3に対して決定した。非標的化非コンジュゲートの10 nMのSO1861と組み合わせた高EGF-ジアンチン濃度により効果的な細胞死滅は観察されなかった一方で（SKBR3（示される）及びBT474（示されない）: [毒素] IC50>10,000 pM; 図21B; 図A7）、低EGF-ジアンチン濃度と組み合わせた9.4 nMのトラスツズマブ-SO1861で既に、効率的な細胞死滅を誘導した（SKBR3: [毒素] IC50=3 pM（示される）; BT474: [毒素] IC50=1 pM（示されない）; 図21B; 表A7）。同等の細胞死滅効率は、高濃度（1075 nM）の非標的化非コンジュゲートSO1861が低濃度のEGF-ジアンチンと組み合わせられるときに達成される（図21B; 表A7）。このことは、トラスツズマブにコンジュゲートされる時、低い濃度のSO1861が、相対的に低い濃度のEGF-ジアンチンと組み合わせて高HER2発現細胞を効率的に死滅させることができることを示す。低濃度のEGF-ジアンチンと組み合わせた高濃度（1500 nM）の非標的化非コンジュゲートSO1861は、2-標的2-構成成分系において両方のコンジュゲートが異なる受容体を介して、HER2を介してSO1861及びEGFR受容体を介して毒素が送達されるので、受容体競合がSO1861の細胞への進入に役割を果たさないため、同等の活性を有する。

【0274】

次に、トラスツズマブ-SO1861を、5 pM セツキシマブ-サポリンの固定された濃度に対して滴定し（SO1861の濃度に対して計算される）、低HER2、低/高EGFR発現細胞に対する細胞死滅を決定し、5 pM セツキシマブ-サポリンが高濃度の非標的化非コンジュゲートSO1861と組み合わせられたときに細胞死滅を示した（JIMT-1: [SO1861] IC50>1000 nM; A431: [SO1861] IC50>1000 nM; 図22A、22B; 表A6）。5 pM セツキシマブ-サポリンと増加した濃度のトラスツズマブ-SO1861の組み合わせは、両方の細胞株において高濃度のセツキシマブ-SO1861でのみ細胞死滅を示した（JIMT-1: [SO1861] IC50>1000 nM; A431: [SO1861] IC50>1000 nM; 図22A、22B; 表A6）。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内SO1861濃度が、エンドソームタンパク質毒素脱出及び毒素媒介性の細胞死滅を誘導するための（閾値）に達しないことを示す。次に、セツキシマブ-サポリンを、トラスツズマブ-SO1861の固定された濃度に対して滴定し、JIMT-1及びA431に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。細胞死滅は、10 nM トラスツズマブ-SO1861と組み合わせた高セツキシマブ-サポリン濃度のみで観察された（JIMT-1: [毒素] IC50>90 pM; A431: [毒素] IC50>20 pM; 図22C、22D; 表A7）。低濃度のセツキシマブ-サポリンと組み合わせた高濃度の非コンジュゲートSO1861（1500 nM）は、効率的な細胞死滅を示

10

20

30

40

50

す（JIMT-1：[毒素] IC50=0.02 pM；A431：[毒素] IC50=0.03 pM；図22C、22D；表A5）。このことは、低HER2、低／高EGFR発現を有する細胞が、細胞内の毒素の効率的な細胞質内送達を確実にする十分なSO1861の進入を促進する十分なHER2受容体の欠如に起因して、トラスツズマブ-SO1861+セツキシマブ-サポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。A431細胞における非常に高いEGFR発現でさえ、トラスツズマブ-SO1861を介するSO1861の取り込みを促進するであろうHER2受容体の欠如に起因してSO1861の閾値に達しなかったため、セツキシマブ-サポリンによる効率的な細胞死滅をもたらさなかった。

【0275】

実施例10.

2標的2構成成分系は、非常に低い標的発現細胞の細胞死滅をもたらす。A431細胞において、TDM1は、ナノモル濃度で細胞を死滅させる一方で、標的化2構成成分系は、ピコモル濃度で細胞を効率的に死滅させることができる（毒素濃度における約7000倍の低下）（図23）。

【0276】

実施例11. 作用機序

エンドソーム酸性化が妨げられるとき、標的化2構成成分系は、SPT001（植物由来のサポニン、SO1861）が低いエンドソームpHでわずかに活性であるという事実

に起因して、活性ではない。

【0277】

実施例12

エンドソーム酸性化阻害剤は、標的化2構成成分系活性を妨げ、エンドソームの酸性化

が妨げられるときにSO1861機能が低減されることを示している。

【0278】

実施例13

図24A～Eは、トラスツズマブ（図24A）、セツキシマブ（図24B）又はTDM1（図24C）、遊離毒素サポリン（図24D）及びジアンチン（図24D）、非細胞結合IgGにカップリングされたサポリン（図24D）、及び遊離サポニンSO1861と合わせられた非細胞結合IgGにカップリングされたサポリン（図24E）が、指定の細胞株SK-BR-3、JIMT-1、MDA-MB-468、A431、CasKi、HeLa、A2058、BT-474と接触されるとき

の相対的な細胞生存率を示す。

【0279】

トラスツズマブ及びセツキシマブは、細胞株の大部分に暴露されるとき細胞生存率に影響を及ぼさないか又はほとんど影響を及ぼさず、トラスツズマブが相対的に高い用量でSK-BR-3細胞に暴露されるときに細胞生存率に多少の影響を及ぼし、及びセツキシマブが相対的に高い用量でMDA-MB-468細胞に暴露されるときに細胞生存率に多少の影響を及ぼす。

【0280】

TDM-1、又はado-トラスツズマブエムタンシンは、ハーセプチン（化学名：トラスツズマブ）及びタキサン化学療法で以前に治療されたHER2陽性転移性乳癌；残存病変がハーセプチン及びタキサン化学療法によるネオアジュバント（手術前）治療後に見出された場合、手術後の初期HER2陽性乳癌を治療するためにアメリカ食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration）によって承認された標的化療法である。TDM-1は、ハーセプチン及び化学療法薬エムタンシンの組み合わせである。図24Cは、TDM-1が、治療される全ての細胞株に関して細胞生存率の低下をもたらすことを示す。

【0281】

試験された細胞株上の細胞表面分子のいずれかに対して親和性を有しない対照IgGにカップリングされた遊離毒素サポリン及びジアンチン及び毒素サポリンは、最大1000

10

20

30

40

50

0 pMの試験された広範な濃度の毒素にわたって細胞生存率に対して影響を及ぼさないか又はほとんど影響を及ぼさない。

毒素サポリンが非細胞結合IgGにカップリングされるとき、コンジュゲートを遊離サポニンSO1861と合わせることによって、相対的な細胞生存率のIgG-サポリン用量依存的な低下をもたらす(図24E)。

【0282】

【表8】

表A5. mAb、毒素、リガンド毒素又はmAb-毒素単剤療法+/- SO1861に関するIC50値の概要。

細胞株	EGFR発現レベル(MFI)	HER2発現レベル(MFI)	トラスツズマブ(nM)	セツキシマブ(nM)	T-DM1(nM)	サポリン(pM)		IgG-サポリン(pM)		トラスツズマブ-サポリン(pM)		トラスツズマブ-ジアンチン(pM)		セツキシマブ-サポリン(pM)		EGF-ジアンチン(pM)	
						No	SO1861	No	SO1861	No	SO1861	No	SO1861	No	SO1861	No	SO1861
MDA-MB-468	1656	1	> 3,000	> 3,000	80	> 10,000	20	> 10,000	30	> 10,000	25	> 10,000	200	180	0.06	240	0.09
A431	1583	10	> 3,000	> 3,000	80	> 10,000	n.d.	> 10,000	90	> 10,000	0.8	> 10,000	80	40	0.03	700	0.03
CaSki	481	12	> 3,000	> 3,000	40	> 10,000	15	> 10,000	80	> 10,000	0.2	> 10,000	5	40	0.02	2000	0.03
SK-BR-3	28	1162	> 3,000	> 3,000	1	> 10,000	n.d.	> 10,000	100	4500	0.05	> 10,000	1	n.d.	n.d.	> 10,000	0.5
JMT-1	58	74	> 3,000	> 3,000	10	> 10,000	30	> 10,000	90	> 10,000	0.1	> 10,000	40	300	0.02	> 10,000	0.07
HeLa	91	7	> 3,000	> 3,000	40	> 10,000	30	> 10,000	200	> 10,000	0.4	> 10,000	18	60	0.03	3800	0.04
A2058	1	5	> 3,000	> 3,000	20	> 10,000	n.d.	> 10,000	90	> 10,000	0.5	> 10,000	5	> 10,000	20	> 10,000	30

表A5の凡例:

* MDA-MB-468 細胞は、5 nM を超える全てのセツキシマブ[]での細胞生存率において20-25%の低下を示す

** SK-BR-3 細胞は、1 nM トラスツズマブで細胞生存率の20%の低下及び1 nM を超える全てのトラスツズマブ[]で30-35%の低下を示す

【0283】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 A6. 固定[mAb-毒素]による非標的化 SO1861 標的化 2-構成成分系 mAb-SO1861 滴定の IC50 値のデータ概要。

			非標的化 SO1861				1-標的 2-構成成分				2-標的 2-構成成分		
							EGFR に対する SO1861 及び 毒素の両方		HER2 に対する SO1861 及び 毒素の両方		EGFR に対する SO1861; HER2 に対する 毒素	HER2 に対する SO1861; EGFR に対する 毒素	
細胞株	EGFR 発現レベル (MFI)	HER2 発現レベル (MFI)	SO1861 + 50 pM トラスツズマブ-サボリン (IC50, nM)	SO1861 + 50 pM トラスツズマブ-ジアンチン (IC50, nM)	SO1861 + 10 pM セツキシマブ-サボリン (IC50, nM)	SO1861 + 10 pM EGF-ジアンチン (IC50, nM)	10 pM セツキシマブ-サボリン + セツキシマブ-SO1861 (IC50, nM)	10 pM ジアンチン+EGF + セツキシマブ-SO1861 (IC50, nM)	50 pM トラスツズマブ-サボリン + トラスツズマブ-SO1861 (IC50, nM)	50 pM トラスツズマブ-ジアンチン + トラスツズマブ-SO1861 (IC50, nM)	50 pM トラスツズマブ-サボリン + セツキシマブ-SO1861 (IC50, nM)	5 pM セツキシマブ-サボリン + トラスツズマブ-SO1861 (IC50, nM)	1.5 pM ジアンチン+EGF + トラスツズマブ-SO1861 (IC50, nM)
MDA-MB-468	1656	1	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	3	6	> 1,000	> 1,000	18	> 1,000	> 1,000
A431	1593	10	> 1,000	> 1,000	600	> 1,000	5	8	> 1,000	> 1,000	12	> 1,000	> 1,000
CaSk i	481	12	> 1,000	> 1,000	700	> 1,000	5-10	10	> 1,000	> 1,000	40	> 1,000	> 1,000
SK-BR-3	28	1162	700	n.d.	800	650	> 1,000	> 1,000	2*	3*	> 1,000	n.d.	3
JIMT-1	58	74	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
Hcl.a	91	7	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
A2058	1	5	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000

【 0 2 8 4 】

【表 10】

表 A7. 固定[mAb-SO1861]による標的化 2-構成成分系、mAb-毒素滴定の IC50 値のデータ概要。各値に関する IC50 は、当該治療に関して一定濃度を有する構成成分(100%)に対するパーセンテージとして計算される

			1-標的 2-構成成分				2-標的 2-構成成分			
			EGFR に対する SO1861 及び 毒素の両方		HER2 に対する SO1861 及び 毒素の両方		EGFR に対する SO1861;HER2 に対 する毒素		HER2 に対する SO1861;EGFR に対 する毒素	
細胞株	EGFR 発現 レベル (MFI)	HER2 発現 レベル (MFI)	278 nM セツキ シマブ- SO1861 + セツキ シマブ- サポリ ン (IC50, pM)	278 nM セツキ シマブ- SO1861 + EGF-ジ アンチ ン (IC50, pM)	300 nM トラスツズ マブ- SO1861 + トラスツズ マブ- サポリ ン (IC50, pM)	300 nM トラスツズ マブ- SO1861 + トラスツズ マブ-ジ アンチ ン (IC50, pM)	278 nM セツキシ マブ- SO1861 + トラスツズ マブ- サポリ ン (IC50, pM)	1388 nM セツキシ マブ- SO1861 + トラスツズ マブ- ジアンチ ン (IC50, pM)	300 nM トラスツズ マブ- SO1861 + セツキシ マブ- サポリ ン (IC50, pM)	300 nM トラスツズ マブ- SO1861 + EGF-ジ アンチ ン (IC50, pM)
MDA-MB-468	1656	1	0.5	1	> 10.000	> 10.000	55	500	100	750
A431	1593	10	0.4	0.4	> 10.000	> 10.000	3	30	20	2.300
CaSki	481	12	2	1	> 10.000	> 10.000	1	25	14	1.600
SK-BR-3	28	1162	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
JIMT-1	58	74	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	3.000	> 10.000	90	4.000
HeLa	91	7	6.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	10.000	50	4.000
A2058	1	5	> 10.000	> 10.000	> 1.0000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10000	> 10.000

【0285】

実施例 14 - 生存及び腫瘍退縮における ADC 結果と組み合わせた本発明のコンジュゲートによる哺乳動物担腫瘍動物の治療

雌 Balb/c ノードマウスに、ヒト A431 腫瘍細胞の懸濁液を皮下注射した。マウスの皮下で、ヒト表皮癌が、異種移植動物腫瘍モデルにおいて発症した。腫瘍細胞の注射後、異種移植腫瘍を、およそ 170 ~ 180 mm³ のサイズまで発達させた。A431 腫瘍細胞は、以下の特徴を有する：高 EGFR 発現体、中 CD71 発現体、低 HER2 発現体。

【0286】

表 8A において、対照マウス及び担腫瘍マウスの治療の結果が示される。担腫瘍マウスを、異種移植腫瘍上の細胞表面受容体であるヒト Her2/neu、ヒト EGFR、又はヒト CD71 のいずれかに向けられる指定の抗体で治療した。セツキシマブは、サポニン SO1861 と共有結合的にコンジュゲートされた。SO1861 はまず、リンカー EMCH (N-ε-マレイミドカブロン酸ヒドラジド) とともに提供され、EMCH は、スルフヒドリル (抗体の還元されたシステイン) をカルボニル (アルデヒド又はケトン; ここでは、サポニンの C-23 位でのアルデヒドのカルボニル) に共有結合的にコンジュゲートするためのマレイミド-及びヒドラジドクロスリンカーである。サポニン-EMCH を、セツキシマブの還元されたシステインに共有結合的にカップリングして、EMCH とシステイン側鎖の間で共有結合性のチオエーテル結合を形成した。ADC トラスツズマブ-サポリン (共有結合性コンジュゲート) 及び抗 CD71 mAb (OKT-9、IgG

）－サポリン（共有結合性コンジュゲート）を、マウスにおいてADCによる治療の開始後の時間で腫瘍体積として測定されるそれらの腫瘍攻撃の有効性に関して試験した。ADCの用量は、腫瘍モデルにおいて最適以下であった。すなわち、前の実験から、ADCの最適以下の用量では、腫瘍退縮又は腫瘍増殖の停止が観察可能ではないことが確立された。【0287】

【表11】

表 8A: 生存及び腫瘍退縮における ADC 結果と組み合わせた本発明のコンジュゲートによる哺乳動物担腫瘍動物を治療する結果			
治療群	患者/健常動物	治療	腫瘍サイズ (mm ³ 単位の体積又は増殖の場合 '+', 退縮の場合 '-', 及び増殖も退縮もない場合 '安定')
1	異種移植	溶媒	2000 mm ³ (死亡/安楽死)
2	異種移植	トラスツズマブ-サポリン	2000 mm ³ (死亡/安楽死)
3	異種移植	抗 CD71 mAb OKT-9 - サポリン (共有結合性コンジュゲート)	2000 mm ³ (死亡/安楽死)
4	異種移植	セツキシマブ-SO1861 (共有結合性コンジュゲート)	2000 mm ³ (死亡/安楽死)
5	異種移植	セツキシマブ	> 170 mm ³ , < 2000 mm ³ (死亡/安楽死)
6	異種移植	トラスツズマブ-サポリン (共有結合性コンジュゲート) + セツキシマブ-SO1861 (共有結合性コンジュゲート)	治療開始時の 180 mm ³ から 80 mm ³ への腫瘍退縮 (生存)
7	異種移植	抗 CD71 mAb OKT-9- サポリン (共有結合性コンジュゲート) + セツキシマブ-SO1861 (共有結合性コンジュゲート)	治療開始時の 180 mm ³ から 40 mm ³ への腫瘍退縮 (生存)

【0288】

これらの結果は、ADC単独での担癌マウスの治療が考慮されるときに効果的ではない（腫瘍増殖、マウスの死亡が予防されない（安楽死））用量のADCと、サポニン、すなわち、SO1861に共有結合された腫瘍細胞特異的受容体標的化抗体からなる本発明のコンジュゲート（単独で投与されるときに有効ではない（腫瘍増殖、マウスの死亡が予防されない（安楽死））用量で癌に罹患しているマウスに投与される共有結合性コンジュゲート）との組み合わせ療法が、治療される動物の腫瘍の退縮及び生存の延長（実験の期間を超える）として表される効率的及び効果的な治療レジメンを提供することを実証している。したがって、単独で投与されるときに抗腫瘍活性を有しない本発明の共有結合されたサポニンを含むコンジュゲートと合わされたADCの最適以下の用量は、癌患者に関する効果的な治療選択肢を提供し、相対的に低い用量のADCが効果的である。ADCのより低い用量は、有害事象のリスクが少ないか、又は副作用が全くないという見込みを有する。加えて、ADCの有効性が考慮されるときにサポニンを有するコンジュゲートの刺激効

果は、腫瘍患者治療が考慮されるときに有効性を欠くことが以前に証明されたADCが、ADC有効性が本明細書の例で実証されたとおりの組み合わせ療法の設定において改善されるため、再認識され及び価値が高まる可能性があることを示している。ヒト臨床現場において以前に調査されたが、いくつかのADCに関してさらなる臨床的検討から撤退された当技術分野で知られるADCに対する参照がなされる。特に、観察される有効性がないこと及び／又は許容されない有害事象の発生に起因して臨床開発が終わったADCは、試験されたセツキシマブーサポニンなどの共有結合されたサポニンを含むコンジュゲートと組み合わせられるときに癌患者に関して新たな価値を得る可能性があるADCである。

【0289】

実施例15－エンドソーム／リソソーム脱出強化活性を有するQS-21を含むキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) のサポニン混合物

スキームQは、一連のQS-21サポニンの共通の分子構造を示す（部分的にConrado Pedebos, Laercio Pol-Fachin, Ramon Pons, Cilaine V. Teixeira Hugo Verli, Atomic Model and Micelle Dynamics of QS-21 Saponin, Molecules 2014, 19, 3744-3760を参考にした；4種の異性体、示されるグリカンの各々がR基として結合され得る）。キラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) から得られる水溶性サポニンの混合物 (Sigma-Aldrich、製品番号S4521；Roth、物品番号6857；InvivoGen、製品「Quil-A」) は、混合物中に存在する少なくとも1つの個々のサポニン、例えば、QS-21のエンドソーム／リソソーム脱出強化特性に基づくか、又はQS-21及びQS-7などの混合物によって含まれるサポニンの2つ以上の組み合わせに基づく本発明のエンドソーム／リソソーム脱出強化コンジュゲート、組成物及び組み合わせにおいて適用され得る。

【0290】

本発明者らは、2.5マイクログラム／mL用量でのキラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) 由来のサポニンの混合物が、細胞系バイオアッセイにおいて哺乳動物腫瘍細胞で試験されたとおり、ジアンチンのエンドソーム脱出を強化することができたことを実証した。細胞に暴露されるエフェクター分子は、リガンドEGFに共有結合的にカップリングされたジアンチン：EGF-ジアンチンであった。試験された細胞は、遊離サポニンに関しては腫瘍細胞株HeLaであり、セツキシマブに共有結合的にカップリングされるときにサポニンを試験することに関してはA431、MDA-MB-468、Caski及びA2058であった。

【0291】

10

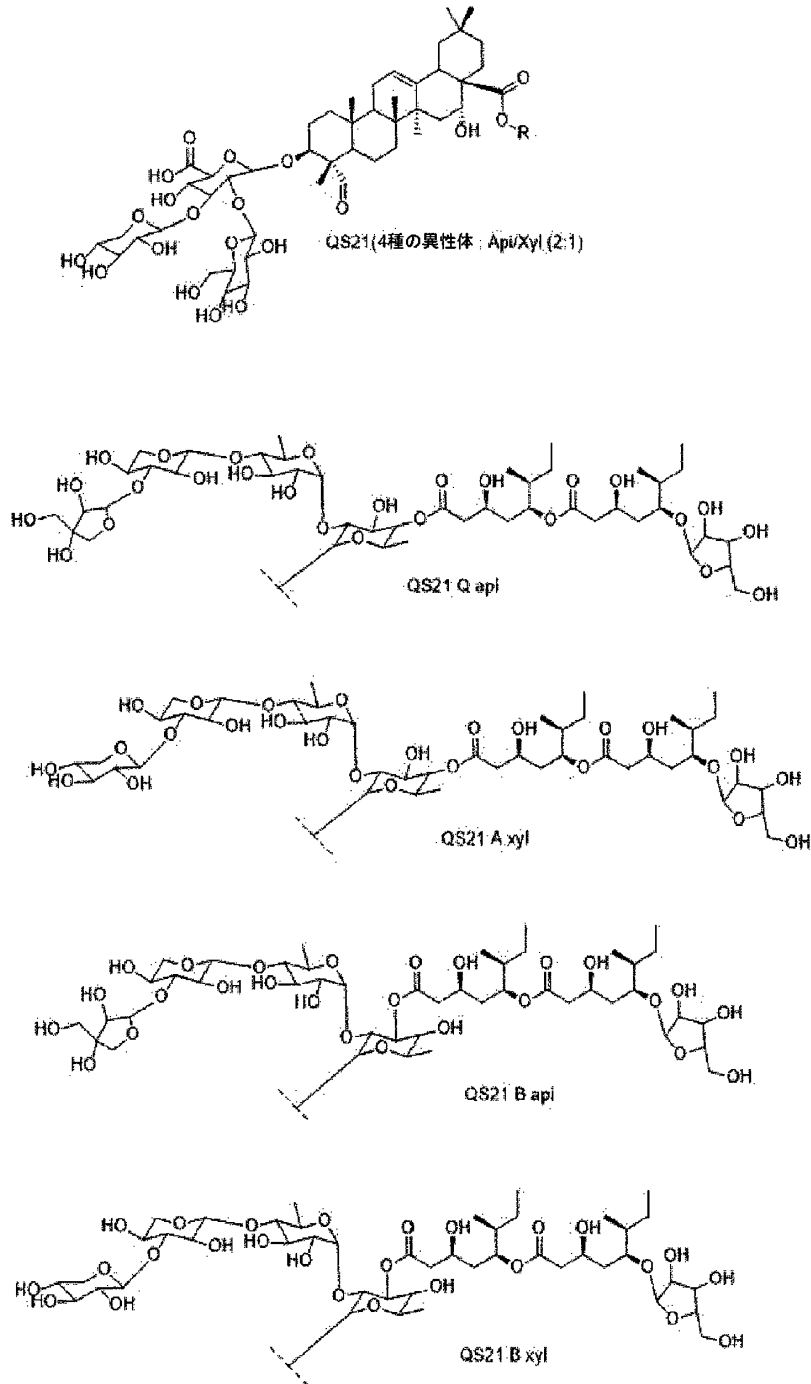
20

30

40

50

【化 3】



(スキーム Q)

【0292】

実施例 16

1 標的 2-構成成分系 (1T2C) は、図 1A、E に示されるとおり、mAb1-タンパク質毒素及び mAb1-SO1861 の組み合わせ治療である。SO1861-EMCH を、両方ともに DAR4 で、システイン残基 (Cys) を介してコンジュゲートし、HSP27BNA オリゴを、リジン残基を介してセツキシマブ (ヒト EGFR を認識し、結合するモノクローナル抗体) にコンジュゲートして、2つのコンジュゲートの生成をもたらす: セツキシマブ- (Cys-L-SO1861)⁴ 及び セツキシマブ- (Lys-L-HSP27BNA)⁴。セツキシマブ- (Cys-L-SO1861)⁴ (腹腔内投与

、(i.p.)及びセツキシマブー(Lys-L-HSP27BNA)⁴(静脈内投与、(i.v.))の組み合わせは、EGFR腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシング活性に関してA431異種移植マウス腫瘍モデルにおいて試験された。投与は、腫瘍がおおよそ150mm³のサイズに達したときに12日目に開始され、腫瘍試料は、最初の投与の72時間後に回収され、対照遺伝子mRNA発現レベル(参照遺伝子)と比較してHSP27遺伝子発現について分析された。これは、50mg/kg セツキシマブー(Cys-L-SO1861)⁴+25mg/kg セツキシマブー(Lys-L-HSP27BNA)⁴の1回の投与が、セツキシマブー(Cys-L-SO1861)⁴又はセツキシマブー(Lys-L-HSP27BNA)⁴単剤療法の単回投与と比較してA431腫瘍においてHSP27遺伝子発現の50%の低下をもたらしたことを明らかにした(図25)。

溶媒対照腫瘍と比較して、40%のHSP27遺伝子サイレンシングの低下が観察された。これは、1T2Cの本発明によるセツキシマブにコンジュゲートされたSO1861+セツキシマブにコンジュゲートされたHSP27BNAオリゴの組み合わせが、固形腫瘍細胞の細胞質において治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な標的化送達を誘導することによって、インビボでの腫瘍に標的化された遺伝子サイレンシングを誘導することを示し、可能にする。

【0293】

次に、SO1861-EMCHを、システイン残基(Cys)を介して、DAR 4でトラスツズマブ(ヒトHER2を認識し、結合するモノクローナル抗体)にコンジュゲートして、トラスツズマブー(Cys-L-SO1861)⁴の生成をもたらした。トラスツズマブー(Cys-L-SO1861)⁴及びトラスツズマブーサポリン(トラスツズマブタンパク質毒素コンジュゲート)の組み合わせを、高HER2発現レベル及びトラスツズマブ単剤療法に対する抵抗性を有するマウス腫瘍モデル(患者由来の異種移植腫瘍モデル、PDX)において試験した。40mg/kg トラスツズマブー(Cys-L-SO1861)⁴(腹腔内投与、(i.p.))+0.03(1、8日目)/0.02(15、22、30、36、43日目)mg/kg トラスツズマブーサポリン(静脈内投与、(i.v.))の1T2Cの本発明による組み合わせは、溶媒対照及び40mg/kg トラスツズマブー(Cys-L-SO1861)⁴又は0.03/0.02mg/kg トラスツズマブーサポリン単剤療法と比較して強力な腫瘍増殖阻害を明らかにした(図26)。

加えて、より低い用量の組み合わせ(40mg/kg トラスツズマブー(Cys-L-SO1861)⁴+0.01mg/kg トラスツズマブーサポリン)で治療された担腫瘍マウスにおいて、腫瘍増殖阻害活性は観察されなかった(図26)。これは、トラスツズマブにコンジュゲートされたSO1861+トラスツズマブにコンジュゲートされたタンパク質毒素の1T2Cの組み合わせが、固形腫瘍細胞の細胞質において治療用タンパク質毒素の効率的な標的化送達を誘導することによって、インビボでの腫瘍細胞死及び腫瘍増殖阻害を誘導することを示し、可能にする。

【0294】

実施例17. 2標的2-構成成分系(インビボ)

2標的2-構成成分系(2T2C)は、mAb1-SO1861及びmAb2-タンパク質毒素の組み合わせ治療である(図1B~D)。SO1861-EMCHを、システイン残基(Cys)を介してDAR4でセツキシマブ(ヒトEGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体)にコンジュゲートして、セツキシマブー(Cys-L-SO1861)⁴の生成をもたらした。セツキシマブー(Cys-L-SO1861)⁴及びトラスツズマブーサポリン又はCD71mab-サポリンの組み合わせを、図1B~Dに示されるとおりEGFR腫瘍標的化細胞死滅に関してA431(EGFR⁺⁺/HER2^{+/+}/CD71⁺)異種移植「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて試験した。用量漸増を実施して、治療有効性を決定した(9日目:0.3mg/kg トラスツズマブーサポリン又は0.1mg/kg CD71mab-サポリン+5mg/kg セツキシマブー(Cys-L-SO1861)⁴;14、18日目:0.1mg/kg トラスツズマブーサポリン又は0.05mg/kg CD71mab-サポリン+5mg/kg セツキシマブー(Cy

s-L-SO1861)⁴; 21日目: 0.05mg/kg トラスツズマブ-サポリン又は0.05mg/kg CD71mab-サポリン+15mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)⁴; 28日目: 0.02mg/kg トラスツズマブ-サポリン又は0.02mg/kg CD71mab-サポリン+15mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)⁴ トラスツズマブ-サポリン/セツキシマブ-SO1861。対照は、それぞれ同じ投与スキームで行われ、セツキシマブのみ(i.v.)、治療日毎に25mg/kgで与えられた)。32日目(破線の鉛直線)、35日目及び39日目に、本発明者らは、25mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)⁴(腹腔内注射(i.p.))+0.02mg/kg トラスツズマブ-サポリン又は0.02 CD71mab-サポリン(静脈内投与、(i.v.))の2T2Cの本発明による組み合わせを開始し、これは、溶媒対照、25mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)⁴又は0.02mg/kg トラスツズマブ-サポリン/CD71mab-サポリン単剤療法と比較して両方の2T2C組み合わせ群に関して強力な腫瘍退縮を明らかにした(図27)。2T2C系は、臨床的に使用されるEGFRに対するモノクローナル抗体であるセツキシマブをも凌駕している。次に、本発明者らは同じ実験を実施したが、続いて、9及び14日目の投与、その後の週1回の投与による25mg/kg セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)⁴(腹腔内注射(i.p.))+0.03mg/kg トラスツズマブ-サポリン又は0.03 CD71mab-サポリン(静脈内投与、(i.v.))治療で試験を開始した。本発明による2T2C系は、全てのマウスにおいて腫瘍退縮を示し、さらに両方の2T2C群の1頭のマウスは、完全な腫瘍根絶(腫瘍体積=0mm³)を示した(図28)。またここで、対照は、腫瘍体積の著しい増大を示した一方で、このA431マウスモデルに関する陽性対照であるセツキシマブは、腫瘍増殖阻害のみを示し、退縮を示さなかった(図28)。これは、セツキシマブにコンジュゲートされたSO1861+トラスツズマブにコンジュゲートされたタンパク質毒素又はCD71mabにコンジュゲートされたタンパク質毒素の2T2C系のアプローチが、インビボで担腫瘍マウスの固形腫瘍の細胞質内への治療用タンパク質毒素の非常に効率的な標的化送達を誘導することによって、サイズが大きい腫瘍(2000mm³)においても一部のマウスでさらに完全な腫瘍根絶及び他のマウスでは強力な腫瘍退縮を誘導することを示し、可能にする。

【0295】

実施例18. 2標的2-構成成分系(インビトロ)

結果

2標的2-構成成分系(2T2C)は、mAb1-SO1861及びmAb2-タンパク質毒素の組み合わせ治療である(図1B~D)。SO1861-EMCHを、システイン残基(Cys)を介してDAR 3.7でセツキシマブ(ヒトEGFRを認識し、結合するモノクローナル抗体)にコンジュゲートした(セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,7})。セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,7}を、50pM トラスツズマブ-サポリン(タンパク質毒素、サポリンにコンジュゲートされたトラスツズマブ)の固定された濃度に対して滴定し、EGFR/HER2発現細胞(A431、EGFR⁺⁺/HER2^{+/+}; CaSKI、EGFR⁺/HER2^{+/+})に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を、図1B~Dに示されるとおりに決定した。これは、低濃度のセツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,7}(A431: IC50=3nM及びCaSKI IC50=10nM; 図29A、29B)で強力な細胞死滅を明らかにした一方で、同濃度のセツキシマブ、セツキシマブ-(Cys-L-SO1861)^{3,7}又はセツキシマブ+50pM トラスツズマブ-サポリンは、EGFR/HER2発現細胞においていずれの細胞死滅活性も誘導できなかった。これは、相対的に低い濃度のセツキシマブ-SO1861コンジュゲートが、トラスツズマブにコンジュゲートされたタンパク質毒素のエンドソーム脱出を効率的に強化することによって(非有効濃度で)、高EGFR/低HER2発現細胞の効率的な細胞死滅を誘導することを示す。

【0296】

次に、トラスツズマブーサポリンを、75 nMのセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}の固定された濃度に対して滴定し、EGFR/HER2発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のトラスツズマブーサポリンと組み合わせた75 nM セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}で既に、EGFR/HER2発現細胞における効率的な細胞死滅を誘導したことを明らかにした一方で (A431: IC50=5 pM; 及びCaSKI: IC50=1 pM; 図29C及び29D)、トラスツズマブーサポリン単独又はトラスツズマブーサポリン+75 nM セツキシマブは、両方の細胞株において著しい細胞死滅活性 (IC50>10,000 pM)を示さなかった (図29C、29D)。このことは、相対的に低い濃度のトラスツズマブーサポリンが、高EGFR/低HER2発現細胞において低セツキシマブーSO1861コンジュゲート濃度と組み合わせて効果的であり及び細胞死滅を誘導できることを示す。

【0297】

次に、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}を、50 pM トラスツズマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し、HeLa (EGFR⁺/HER2⁺/-)又はA2058 (EGFR⁻/HER2⁺/-)に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を、図1B~Dに示されるとおりに決定した。HeLa (EGFR⁺/HER2⁺/-)及びA2058 (EGFR⁻/HER2⁺/-)細胞の両方ともに、低濃度のセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}+50 pM トラスツズマブーサポリンで細胞死滅を示さない (HeLa: IC50=400 nM; A2058: IC50>400 nM; 図30A、30B)。これは、十分な受容体発現がない場合、有効な細胞内送達SO1861濃度が、タンパク質毒素のエンドソーム脱出及び細胞質内送達を誘導するための (閾値) に達しないことを示す。次に、トラスツズマブーサポリンを、75 nMのセツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}の固定された濃度に対して滴定し、HeLa (EGFR⁺/HER2⁺/-)又はA2058 (EGFR⁻/HER2⁺/-)に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。HeLa (EGFR⁺/HER2⁺/-)及びA2058 (EGFR⁻/HER2⁺/-)は両方ともに、細胞死滅活性を示さなかった (HeLa: IC50>10,000 pM; A2058: IC50>10,000 pM; 図30C、30D)。このことは、低又は無EGFR受容体発現を有する細胞が、細胞の細胞質内の毒素のエンドソーム脱出を確実にする十分なSO1861 (閾値) の抗体媒介性送達を促進する十分なEGFR受容体の欠如に起因して、セツキシマブー (Cys-L-SO1861)^{3,7}+トラスツズマブーサポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

【0298】

次に、SO1861-EMCHを、システイン残基 (Cys) を介して、DAR 4でトラスツズマブ (ヒトHER2を認識し、結合するモノクローナル抗体) にコンジュゲートした (トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴)。トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴を、1.5 pM EGFジアンチン (EGFR標的化リガンド毒素融合タンパク質) の固定された濃度に対して滴定し、HER2/EGFR発現細胞 (SK-BR-3: HER2⁺⁺/EGFR⁺/-)に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のトラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴+1.5 pM EGFジアンチンで強力な細胞死滅を明らかにした一方で (SK-BR-3: IC50=1 nM; 図31A)、同濃度のトラスツズマブ、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴又はトラスツズマブ+1.5 pM EGFジアンチンは、HER2⁺⁺/EGFR⁺/-発現細胞においていずれの細胞死滅活性も誘導できなかった。これは、トラスツズマブにコンジュゲートされたSO1861が、EGF融合タンパク質毒素のエンドソーム脱出を効率的に強化することによって (非有効濃度で)、高HER2/低EGFR発現細胞の細胞死滅を誘導することを示す。

【0299】

次に、EGFジアンチンを、2.5 nMのトラスツズマブー (Cys-L-SO186

10

20

30

40

50

1) ⁴の固定された濃度に対して滴定し、SK-BR-3 (HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}) 発現細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のEGFジアンチンと組み合わせた2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴で既に、HER2/EGFR発現細胞において効率的な細胞死滅を誘導したことを明らかにした一方で (SK-BR-3: IC50=1 pM) (図31B)、EGFジアンチン単独又はEGFジアンチン+2.5 nM トラスツズマブは、細胞死滅活性を示さなかった (IC50>10,000 pM) (図31B)。このことは、相対的に低い濃度のEGFジアンチンが、高HER2/低EGFR発現細胞において低トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴濃度との組み合わせにおいてのみ効果的であり及び細胞死滅を誘導できることを示す。

10

【0300】

次に、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴を、1.5 pM EGFジアンチンの固定された濃度に対して滴定し、JIMT-1 (HER2^{+/ -}/EGFR^{+/-}) 又はMDA-MB-468: HER2⁻/EGFR⁺⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。両方の細胞株は、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴+1.5 pM EGFジアンチンのいずれかの組み合わせに対して感受性ではなかった (JIMT-1: IC50>1000 nM; MDA-MB-468: IC50>1000 nM; 図32A、32B)。これは、十分なHER2受容体発現がない場合、有効な細胞内送達SO1861濃度が、タンパク質毒素のエンドソーム脱出及び細胞質内送達を誘導するための (閾値) に達しないことを示す。

20

【0301】

次に、EGFジアンチンを、2.5 nMのトラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴の固定された濃度に対して滴定し、JIMT-1 (HER2^{+/ -}/EGFR^{+/-}) 又はMDA-MB-468 (HER2⁻/EGFR⁺⁺) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。両方の細胞株が、2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴を伴うか又は伴わずに高EGFジアンチン濃度で細胞死滅を示した (JIMT-1: IC50=10.000 pM; MDA-MB-468: IC50=200 pM 図32C、32D)。

【0302】

これら全ては、低又は無HER2受容体発現を有する細胞が、細胞の細胞質内の毒素のエンドソーム脱出を確実にする十分なSO1861 (閾値) の抗体媒介性送達を促進する十分なHER2受容体の欠如に起因して、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ^{3, 7}+1.5 pM EGFジアンチンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

30

【0303】

次に、SO1861-EMCHを、システイン残基 (Cys) を介して、DAR 4でトラスツズマブ (ヒトHER2を認識し、結合するモノクローナル抗体) にコンジュゲートした (トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴)。トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴を、5 pM セツキシマブーサポリン (EGFR標的化抗体-タンパク質毒素コンジュゲート) の固定された濃度に対して滴定し、HER2/EGFR発現細胞 (SK-BR-3: HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を、図1B~Dに示されるとおりに決定した。これは、低濃度のトラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴+5 pM セツキシマブーサポリン (SK-BR-3: IC50=1 nM; 図33A) で強力な細胞死滅を明らかにした一方で、同濃度のトラスツズマブ、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861) ⁴又はトラスツズマブ+5 pM セツキシマブーサポリンは、HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}発現細胞においていずれの細胞死滅活性も誘導できなかった。これは、トラスツズマブにコンジュゲートされたSO1861が、セツキシマブにコンジュゲートされたタンパク質毒素のエンドソーム脱出を効率的に強化することによって (非有効濃度で)、HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}発現細胞の細胞死滅を誘導することを示す。

40

【0304】

50

次に、セツキシマブーサポリンを、 2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 及び 75 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ の固定された濃度に対して滴定し、 HER2/EGFR 発現細胞 ($\text{SK-BR-3:HER2}^{++}/\text{EGFR}^{+/-}$) に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。これは、低濃度のセツキシマブーサポリンと組み合わせた 2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ で既に、 SK-BR-3 細胞において効率的な細胞死滅を誘導したことを明らかにした一方で ($\text{SK-BR-3:IC50} = 1 \text{ pM}$; 図 33B)、セツキシマブーサポリン単独又はセツキシマブーサポリン + 2.5 nM トラスツズマブーは、高濃度のトラスツズマブーサポリンでのみ細胞死滅活性を示した ($\text{SK-BR-3:IC50} > 4000 \text{ pM}$; 図 33B)。このことは、相対的に低い濃度のセツキシマブーサポリンが、 $\text{HER2}^{++}/\text{EGFR}^{+/-}$ 発現細胞において低トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ 濃度との組み合わせにおいてのみ効果的であり及び細胞死滅を誘導できることを示す。

【0305】

次に、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ を、 5 pM セツキシマブーサポリンの固定された濃度に対して滴定し、 JIMT-1 ($\text{HER2}^{+/-}/\text{EGFR}^{+/-}$) 及び MDA-MB-468 ($\text{HER2}^{-}/\text{EGFR}^{++}$) 細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。両方の細胞株は、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ + 5 pM セツキシマブーサポリンの組み合わせに対して感受性ではなかった ($\text{JIMT-1:IC50} > 1000 \text{ nM}$; $\text{MDA-MB-468:IC50} > 1000 \text{ nM}$; 図 34A、34B)。これは、十分な HER2 受容体発現がない場合、有効な細胞内送達 SO1861 濃度が、タンパク質毒素のエンドソーム脱出及び細胞質内送達を誘導するための (閾値) に達しないことを示す。

【0306】

次に、セツキシマブーサポリンを、 2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ の固定された濃度に対して滴定し、 JIMT-1 ($\text{HER2}^{+/-}/\text{EGFR}^{+/-}$) 及び MDA-MB-468 ($\text{HER2}^{-}/\text{EGFR}^{++}$) 細胞に対する標的化されたタンパク質毒素に媒介される細胞死滅を決定した。両方の細胞株が、 2.5 nM トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ を伴うか又は伴わずに同様のセツキシマブーサポリン濃度で細胞死滅を示した ($\text{JIMT-1:IC50} = 80 \text{ pM}$; $\text{MDA-MB-468:IC50} = 100 \text{ pM}$; 図 34C、34D)。

【0307】

このことは、低又は無 HER2 受容体発現を有する細胞が、細胞の細胞質内の毒素のエンドソーム脱出を確実にする十分な SO1861 (閾値) の抗体媒介性送達を促進する十分な HER2 受容体の欠如に起因して、トラスツズマブー (Cys-L-SO1861)⁴ + セツキシマブーサポリンの組み合わせに影響を受けないことを示す。

【0308】

参考文献

- ・Wilton, E. E. et al. (2018) "sdAb-DB: The Single Domain Antibody Database", *ACS Synthetic Biology* 7 (11): 2480-2484. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00407
- ・Marta Kijanka & Frank-Jan Warnders & Mohamed El Khatlabi & Marjolijn Lub-de Hooge & Gooitzen M. van Dam & Vasilis Ntziachristos & Liesbeth de Vries & Sabrina Oliveira & Paul M. P. van Bergen en Henegouwen, "Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 V_HHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided

10

20

30

40

50

surgery”, Eur J Nucl Med Mol Imaging (2013) 40:1718–1729 DOI 10.1007/s00259-013-2471-2 · Karen Mercier, Raimond Heukers and Chiraz Frydman, “Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) – Production of a single domain antibody Q17c directed against recombinant HER2 protein and its binding study by Surface Plasmon Resonance imaging technology”, Horiba Application Note Pharmaceuticals SPRi 42, 2019

10

【0309】

配列番号

配列番号1：ラクダ科由来の抗HER2 sdAb 2Rb17cのアミノ酸をコードするDNA配列

【0310】

【化4】

```
gaagttcagctgcaggaatctggtggtggtctggttcagcggggtggtctctgctctgcttgcgcggcgctggtttcatcttctaacgacgcg
atgacctgggttcgtcaggcgcgggtaaggtctggaatgggtttctctatcaactggtctggtacccacaccaactacgcggactctgttaa
ggtcgtttcacatctctcgtgacaacgcgaaacgtacctgtacctgcagatgaactctctgaaagacgaagacaccgcgctgtactactgcg
ttaccggttacggtgtacaaaaccccgaccggtcagggtaccagggtaccgtttctctcaccaccaccaccaccactctcgtctacccgcg
cgaccccgctctcgtctacccgcgctgc
```

20

【0311】

配列番号2：ラクダ科由来の抗HER2 sdAb 2Rb17cのアミノ酸配列

【0312】

【化5】

```
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFFSNDAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGTHNTYADSVK
GRFTISRDNKRTLYLQMNSLKDEDTALYYCVTGYGVTKTPTGQGTQVTVSSHHHHHHSPSTPPTPS
PSTPPC
```

30

【0313】

配列番号3：ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗HER2 sdAb NB2のアミノ酸をコードするDNA配列

【0314】

【化6】

```
atggaagttcagctggtgaatctggtggtggtctggttcaggcggggtggtctctgctctgcttgcgcggcgctggttatcaccttctatcaaca
ccatgggttggtaccgtcaggcgcgggtaaacagcgtgaactggttcgctgatctctctatcggtgacacctaactacgcggactctgttaaag
gtcgtttcacatctctcgtgacaacgcgaaaaacaccgtttacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcggttactactgcaa
acgtttccgtaccgcggcgagggtaccgactactgggtcagggtaccagggtaccgtttctctcaccaccaccaccaccac
```

40

【0315】

配列番号4：ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗HER2 sdAb NB2のアミノ酸配列

```
MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQ
APGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQVTVSSH
HHHHH
```

50

配列番号 5：抗HER2 sdAb pcNB2、合成コンストラクトのアミノ酸をコードするDNA配列

【0316】

【化7】

atggaagtcagctggtgaaaaaggtggtggtcgtgttcaggcgggtggttctctgcgtctgcgttgcggcgctcgtgtatcaccttctctatcaa
caccatgggttggtaccgtcaggcgccgggtaaacagcgtgaactggtgcgtgatcttctatcggtgacacctactacgcggactctgttaa
aggtcgtttccgtatccgtcgtgacaacgcgaaaaacaccgtttacctcgtatgcgtcgtctgaaaccggaagacaccgcggttactactgca
aacgtttccgtaccgcggcgagggtaccgactactggggtcagggtaccgtgttaccgtttctaaacaccaccaccaccaccac

10

【0317】

配列番号 6：抗HER2 sdAb pcNB2、合成コンストラクトのアミノ酸配列

MEVQLVEKGGGRVQAGGSLRLRCAASGITFSINTMGWYRQ
APGKQRELVALLISSIGDTYYADSVKGRFRIIRDNAKNTVY
LRMRRLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTRVTVSKH
HHHHH

配列番号 7：ラクダ科由来の抗HER1 sdAb 7D12のアミノ酸をコードするDNA配列

【0318】

【化8】

gcggcgagggttaaactggaagaatctggtggtggtctgttcagaccgggtggttctctgcgtctgacctgcggcgctcgtgtacacctcgttc
ttacgggtatgggttggtccgtcaggcgccgggtaagaacgtgaattcgtttcgtgtatcttggcgtggtgactctaccgggtacgcggactcgt
taaaggctggttcaccatctctcgtgacaacgcgaaaaacacgttgacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcgatctacta
ctgcgcggcgccggcggggtctcgtggtacgggtaccctgtacgaatacgaactactggggtcagggtaccagggttaccgtttctct

20

【0319】

配列番号 8：ラクダ科由来の抗HER1 sdAb 7D12のアミノ酸配列

AAQVKLEESGGGSVQTGGSRLRLTCAASGRTSRSYGMGWF
RQAPGKEREFVSGISWRGDS TGYADSVKGRFTISRDN
AKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT
QVTVSS

30

配列番号 9：ラクダ科由来の抗HER1 sdAb 9G8のアミノ酸をコードするDNA配列

【0320】

【化9】

gaagttcagctggttgaatcgtggtggtggtcgttcaggcgggtggttctctgcgtctgttgcggcgctcgtgtacacctctcttctacgcgat
gggttggtccgtcaggcgccgggtaagaacgtgaattcgttggtgcgtcaactggtcttctggttctactactacgcggactctgttaaaggctc
gtttaccatctctcgtgacaacgcgaaaaacaccatgtacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcgggttactactgcgcgg
cgggttaccagatcaactctggttaactacaactcaaagactacgaatacgaactactggggtcagggtaccagggttaccgtttctct

40

【0321】

配列番号 10：ラクダ科由来の抗HER1 sdAb 9G8のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQA
PGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDN
AKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQG
TQVTVSS

配列番号 11：抗VGF2 sdAb NTV1、合成コンストラクトのアミノ酸をコードするDNA配列

50

【0322】

【化10】

atggcgagggtcagctgctggaatctggtggtggtctggtcagccgggtggttctctgctgctcttgcgcggcgctggttactctgttatcaac
gacttcatgacctgggttcgtcaggcgccgggttaaaggctggaatgggtttctctatctctgttgcggacggttctacctactacgcggactctgtt
aaaggctgttcaccatctctctgacaaactctaaaaacacctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcgggttactactg
cgcgcgcggtgtggtggtcgtgacctgggtggccgtacgaactggactactggggtcagggtaccctgggtaccgtttctct

【0323】

配列番号12：抗VGFR2 s d A b NTV1、合成コンストラクトのアミノ酸配列

MAQVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSVINDFMTWVR
QAPGKGLEWVSSISVADGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT
LYLQMNSLR AEDTAVYYCAARVGG RDLGW P Y ELDYWGQGT
LVT VSS

配列番号13：抗VGFR2 s d A b NTV2、合成コンストラクトのアミノ酸をコードするDNA配列

【0324】

【化11】

atggcgagggtcagctgctggaatctggtggtggtctggtcagccgggtggttctctgctgctcttgcgcggcgctggttcaaaatcaccaa
caaaacctggtcggttcgtcaggcgccgggttaaaggctggaatgggtttctctatcggttcttctggttctacctactacgcggactctgt
taaaggctgttcaccatctctctgacaaactctaaaaacacctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcgggttactactg
cgcgcgctgtaaaggtaaccgtctgggtccggcgcgctgctgttctggggtcagggtaccctgggtaccgtttctct

【0325】

配列番号14：抗VGFR2 s d A b NTV2、合成コンストラクトのアミノ酸配列

MAQVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITNK TMAWVR
QAPGKGLEWVSSIGSSSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT
LYLQMNSLR AEDTAVYYCARRKGNRLGPAALRSWGQGT L V
TVSS

配列番号15：抗VGFR2 s d A b NTV3、合成コンストラクトのアミノ酸をコードするDNA配列

【0326】

【化12】

atggcgagggtcagctgctggaatctggtggtggtctggtcagccgggtggttctctgctgctcttgcgcggcgctggttctggttactac
aaatctatgtctgggttcgtcaggcgccgggttaaaggctggaatgggtttctaccatcacctctcgtaacggttctacctactacgcggactctgt
aaaggctgttcaccatctctctgacaaactctaaaaacacctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcgggttactactg
cgcgaccggtcgtgcgcaccacgcgcgggttcgttactggggtcagggtaccctgggtaccgtttctct

【0327】

配列番号16：抗VGFR2 s d A b NTV3、合成コンストラクトのアミノ酸配列

MAQVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGV RVNYKSM SWVR
QAPGKGLEWVSTITSRNGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT
LYLQMNSLR AEDTAVYYCATGRAHHPVRYWGQGT L V T V S S

配列番号17：抗VGFR2 s d A b NTV4、合成コンストラクトのアミノ酸をコードするDNA配列

【0328】

10

20

30

40

50

【化 1 6】

cagggtcagctgcaggaatctggtggtggttctgttcaggcggtggttctctgctgtcttgaccgcgtctggttgcgtgttgacggtaaccgac
atgggttggtaccgtcaggcgccgggtaacgaatgcgaactggttcttctatctcttctatcggtatcggttactactctgaatctgttaaaggctggtt
caccatctctcgtgacaacgcgaaaaacaccgtttacctgcagatgaactctctgcgtccggacgacaccgcggttactactgcggtcgtcgtt
ggatcggttacgttgcggttaactggggtcgtggtacccagggtaccgtttcttct

【0 3 3 5】

配列番号 24 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗 C
TLA-4 sdAb NB16 のアミノ酸配列

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFGVDGTDMGWYRQA
PGNECELVSSISSIGIGYSESVKGRFTISRDNANKNTVYL
QMNSLRPDDTAVYYCGRRWIGYRCGNWGRGTQVTVSS

配列番号 25 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗 C
TLA-4 sdAb NB36 のアミノ酸をコードする DNA 配列

【0 3 3 6】

【化 1 7】

cagggtcagctgcaggaatctggtggtggttctgttcaggcggtggttctctgctgtcttgaccggttctggttacacctacaccatgggttg
ttccgtcaggcgccgggtaagaacgtgaagggtgtgttcgatcaccgcgttcggttctccgttctacgcggactctgttaaaggctgttcaccat
ctctcgtgacaacgcgaacaacaccatcttctgcagatgaactctctgaaccgggaagactctgcgaigtactactgcgcggcggtggttct
ctggtacctcttacaatggaacgaatacgggtcttacaactactggggtcagggtaccagggtaccgtttcttct

【0 3 3 7】

配列番号 26 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗 C
TLA-4 sdAb NB36 のアミノ酸配列

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGSRITYTIMGWFRQAPGK
EREGVVAITAFGSPFYADSVKGRFTISRDNANNTIFLQMN
SLKPEDSAMYYCAARGSSGTSYKWNEYGSYNYWGQGTQVT
VSS

配列番号 27 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗 C
TLA-4 sdAb NB91 のアミノ酸をコードする DNA 配列

【0 3 3 8】

【化 1 8】

cagggtcagctgcaggaatctggtggtggttctgttcaggcggtggttctctgctgtcttgccggcgctctaaatacacctctgcatgggttg
ttccgtcaggcgccgggtaagaacgtgaagggtgtgttcgcacatcgactctggtccgcgtaccctgtacgcggactctgttaaaggctgttcacc
atctctaaagacaacgcgaaaaacacctgtacctggaatgtctacctgaaccggacgacaccgcgatgtactactgcgcggcggttc
cgatgtactctggttcttgcaactacaactactggggtcagggtaccagggtaccgtttcttct

【0 3 3 9】

配列番号 28 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗 C
TLA-4 sdAb NB91 のアミノ酸配列

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASKYTS CMGWFRQAPGK
EREVVAHIDSGPRTLYADSVKGRFTISKDNANKNTLYLEMS
TLKPDDTAMYYCAAGPMYSGSCNYYNYWGQGTQVTVSS

配列番号 29 : ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗ヒ
トPD-L1 sdAb A1 のアミノ酸をコードする DNA 配列

【0 3 4 0】

10

20

30

40

50

【化 19】

Cagggtcagctgcaggaatctgggtgggtctgggtcagccgggtgggtctctgcgtctgtctgcgcggcgctcgggttcacccctggactactacgc
gatcgggtgggtccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaagggtttcttgcacatctcttctgacgggtctactactacgggactctgttaaag
gtcgttcaccatctctcgtgacaacgcgaaaaacaccggttacctgcagatgtcttctgaaaccggaagacaccgcgggttactactgcggta
tctcgtgtcttgccctgctgaagactacgggtatggactactggggtaaaggtagccagggtaccggtttcttct

【0341】

配列番号30：ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗ヒトPD-L1 s d A b A1のアミノ酸配列

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQA
PGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY
LQMSSLKPEDTAVYYCGISGSCLEDYGM DYWGKG GTQVTV
SS

配列番号31：ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗ヒトPD-L1 s d A b B1のアミノ酸をコードするDNA配列

【0342】

【化20】

cagggtcagctgcaggaatctgggtgggtctgggtcaccgggtgggtctctgcgtctgtctgcgcggcgctcgggtttctctggacaactacgcg
atcgggtgggtccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaagggtttcttgcacatctcttgggtctgaagggtcgtctactacgggactctgttaa
ggcgtttcaccatctctcgtgacaacgcgaaaaacaccgcgttctcgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcgggactactactgc
gcgaccgttgggttctgctcttctcagtacgggtatggaatcgttgggtactactggggtaggggtaccagggtaccggtttcttct

【0343】

配列番号32：ヒトコブラクダ (Camelus dromedarius) 由来の抗ヒトPD-L1 s d A b B1のアミノ酸配列

QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFSLDNYAIGWFRQA
PGKEREGVSCISSGSEGRYYADFVKGRFTISRDNANKNTA
FLQMNSLKPEDTADYYCATVGFCS SQYGM E F V G D Y W G Q G T
QVTVSS

配列番号33：抗マウス血清アルブミン s d A b M S A 2 1 (生物体：人工配列) のアミノ酸配列

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQA
PGKGVEWVSGISSLG DSTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLY
LQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSS

配列番号34：抗ヒト血清アルブミン s d A b A l b - 1 (生物体：人工配列) のアミノ酸配列

AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQA
PGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLY
LQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS

配列番号35：抗ヒト血清アルブミン s d A b A l b 2 3 (ヒト化、最適化 A l b 1) (生物体：人工配列) のアミノ酸配列

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQA
PGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTLY
QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS

配列番号36：抗EGFR V_{HH} 7A5 (生物体：人工；組換えペプチド) のアミノ酸配列

EVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASDRTFSSNNMGWFRQA
PGKEREFVAAIGWGGL E T H Y S D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y

10

20

30

40

50

LQMNSLKPEDTARYYCAVSSSTRTVIYTLPRMYNYWGQGTQ
VTVSS

配列番号37：抗EGFR V_{HH} 7D12（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQA
PGKEREFVSGISWRGDS TGYADSVKGRFTISRDN AKNTVD
LQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQV
TVSS

配列番号38：抗EGFR V_{HH} 7C12（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQA
PGKEREFVSGISWRGDS TGYADSVKGRFTISRDN AKNTVD
LQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTQV
TVSS

配列番号39：抗インスリン様増殖因子1受容体 V_{HH} 4B11（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FT FNAMGWYRQA
PGKQRELVAVIISGGSTHYVDSVKGRFTISRDN AKKMYL
QMNSLKPEDTAVYYCNVKKFGDYWGQGTQVTVSS

配列番号40：抗インスリン様増殖因子1受容体 V_{HH} 3G7（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESISTINVM AWYRQA
PGKQRELVAEITRSGRTNYVDSVKGRFTISRDN AKNTMYL
QMNSLNLED TAVYYCRTIDG SWREYWGQGTQVTVSS

配列番号41：抗インスリン様増殖因子1受容体 V_{HH} 2C7（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSNYAIVIGWFR
QAPGQEREFVAAINWNSRSTYYADSVKGRFTISRLN ARNT
VYLQMNRLKPEDTAVYDCAASHDS DYGGTNANLYDYWGQG
GTQVTVSS

配列番号42：抗インスリン様増殖因子1受容体 V_{HH} 1C7（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSRTANAWFRQA
PGKEREFVATITWNSGTTRYADSVKGRFFISKDS AKNTIY
LEMNSLEPEDTAVYYCAATAAAVITPTRGYNYWGQGTQV
TVSS

配列番号43：抗CEACAM V_{HH} NbCEA5（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQA
PGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTVY
LQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGT LVT
VSS

配列番号44：抗CEACAM V_{HH} CEA5（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQA
PGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDN AKNTLY
LQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGT LVT
VSS

配列番号45：抗CD123 V_{HH} 57A07（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSGNVMGWYRRQ
APGKEREWVAAIASGGSIY YRDSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGLGTQVTVSS

配列番号46：抗CD123 V_{HH} 57B04（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGINFRFNSMGWWRRR
APGKEREWVAAITSGDITNYRDSVRGRFTISRDNVKN TVY
LQMNTLKL EDTAVYYCNTFPPIADYWGLGTQVTVSS

配列番号47：抗CD123 V_{HH} 51D09（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGSI FSGNTMGWYRQA
PGKQRELVA AISSGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRPEDTAVYYCNAAILLYRLYG YEEGDYWGLGTLVT
VSS

配列番号48：抗CD123 V_{HH} 55C05（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVPAGDSLRLSCVASGRSLNTYTMGWFRQA
PGKECEEVAAINWNGVYRDYADSAKGRETASRDNAMNTVF
LQMNSLKPEDTAVYFCATATQGWDRHTEPSDFGSWGLGTQ
VTVSS

配列番号49：抗CD123 V_{HH} 50F07（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTGSGSTFSINAMGWYRQA
PGKQRELVAAITSGGR TNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRPEDTAVYYCNARISAGTAFWLWSDY EYWGLGTLV
TVSS

配列番号50：抗CD123 V_{HH} 55F03（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGG PLRLSCAASGR TFS SYVMGWFRQA
PGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVY
LQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGLGTQ
VTVSS

配列番号51：抗CD123 V_{HH} 55A01（生物体：人工；組換えペプチド）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQA
PGNEREFVAATSSSGGSTSY PDSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNI LEEYRYWGLGT
QVTVSS

配列番号52：抗MET V_{HH} 04E09（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFILDY YAI GWFRQA
PGKEREGVLCIDASDDITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNSLKPEDTG VYYCATPIGLSSSC LLEYDYDYWGQGT
LVTSS

配列番号53：抗MET V_{HH} 06B08（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TISR YTMGWFRQA
PGKEREFVAAISWSGDNTNYADSVKGRFTISRPN TKNTMY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADYRSGSY YQASEWTRPSGYDYW
GQGT LVTSS

配列番号54：抗MET V_{HH} 06C12（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLDYFAI GWFRQA

10

20

30

40

50

PGKEREEISCISNSDGSTYYANSVKGRFTISIDNAKNTVY
LQMTSLKPEDTAVYYCATPVGLGPFCKTTNDYDYSQGQGL
VTVSS

配列番号55：抗MET V_{HH} 06F10（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAINWFRQA
PGKEREGVSCISGGDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCATALGLSSSCHGDGYDYWGQGLV
TVSS

配列番号56：抗Her3 V_{HH} 21F6（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYYLNAMGWFRQG
PGKDREFVAAIDWSDGNKDYADSVKGRFTISRDNNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADTPPWGPMIYIESYDSWGQGL
VTVSS

10

配列番号57：抗Her3 V_{HH} 4C7（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQA
PGKGPAAWSTVSPGGITTSYADSVKGRFTISRDNNAKNTLY
LQMNSLKPEDTAVYYCLRD LNNRGQGLVTVSS

配列番号58：抗Her3 V_{HH} 17B5（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIGGLNAMAWYRQA
PGKERELVAGIFGVGSTRYADSVKGRFTISRDIKNTVFL
QMNSLNSEDTAVYYCRMSSVTRGSSDYWGQGTQVTVSS

20

配列番号59：抗Her3 V_{HH} 18G11（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTLFKINAMGWYRQA
PGKRRELVALITSSDTTDYAESVEGRFTISRDNNTWNAVYL
QMNSLKPEDTAVYYCHSDHYSMGVPEKRVIMYGQGTQVTV
SS

配列番号60：抗Her3 V_{HH} 34C7（生物体：人工配列）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLGLSCVASGSIFRINAMAWYRQA
PGKQRELVAEITAGGSTNYADSVKGRFTISVDNAWNTLYL
QMNSLKVEDTAVYYCNLDHYTTWDRRSAYWGQGTQVTVSS

30

配列番号61：抗Her2 V_{HH} 47D5（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGFNDMAWYRQA
PGKQRELVALISRVGVTSSADSVKGRFTISRNVNAKDTVYL
QMNSLKPEDTAVYYCYMDQRLDGSTLAYWGQGTQVTVSS

配列番号62：抗Her2 V_{HH} 2D3（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQV
PGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLY
LQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQV
TVSS

配列番号63：抗Her2 V_{HH} 5F7（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSINTMGWYRQA
PGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYL
QMNSLKPEDTAVYYCKRFRRTAAQGTDYWGQGTQVTVSS

40

配列番号64：抗Her2 V_{HH} 13D11（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCVGSGLDDYGMTWVRRA
PGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNNAKNTLF
LQMNSLNPEDTAVYYCGQGWKIVPTNPRGHGTQVTVSS

配列番号65：抗Her2 V_{HH} 2B4（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVGSGLDDYAMTWVRQA
PGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNNAKNTLF

50

LQMNSLSPEDTAVYYCNQGWKIRPTIPMGHGTQVTVSS

配列番号66：抗Her2 V_{HH} 2G2（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFSLDDYGMTWVRQA
PGKGLEWVSSINWSGTHTDYTDPAVKGRFTISRDNANKNTLF
LQMNNLTPEDTAVYYCNRGWKIVPTDLGGHGTQVTVSS

配列番号67：抗Her2 V_{HH} 13G11（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFISNYAMGWFRQA
APGKEREFVATINWSGSHSDYADSVKGRFTISRDNANKNTV
YLQMNNLKSEDTAVYYCAPGWGTAPLSTSVYWGQGTQVTV
SS

10

配列番号68：抗Her2 V_{HH} 12E33（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGMVQAGGSLRLSCAASGLTLSNYGMGWFRQA
PGKEREFVSSINWSGTHTYDADFVKGRFIIISRDNANKNTVY
LQINSLKPEDTAVYYCAAGGWGTGRYNYWGQGTQVTVSS

配列番号69：抗Her2 V_{HH} 13F21（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCVASGTIVSINATSWYRQA
PGNQRELVAATIIGDGRTHYADSVKDRFTISRDAANLVYL
QMNSLKPSDTAIYSCNANGIESYGWGNRHFNYWTVGQTQV
TVSS

配列番号70：抗Her2 V_{HH} 11A101（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNAMGWFRQAPG
KEREFVAAISRSPGVITYYADSVKGRFTTSRDNANKNTVYLQ
MNDLKPEDTAVYYCAADFYLATLAHEYDYWGQGTQVTVSS

20

配列番号71：抗Her2 V_{HH} 11A22（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQA
PGTEREFIAGIRWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADFVSTLAHEYDYWGQGTQVTV
SS

配列番号72：抗Her2 V_{HH} 12D44（生物体：ラマ）のアミノ酸配列

KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQA
PGTEREFIAGIRWSDGSTYYADSVKGRFTISRANAKNTVY
LQMNGLKPEDTAVYYCAADFVSTLAHEYDYWGQGTQVTV
SS

30

40

50

【図面】

【図 1 a】

図1A

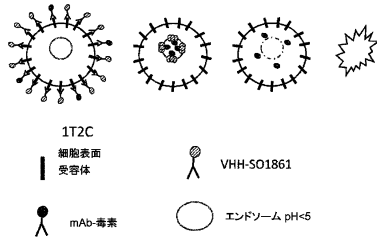
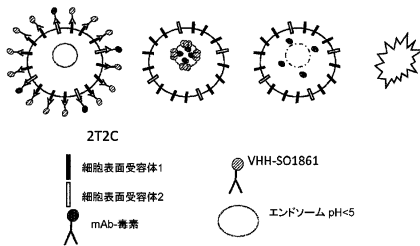


図1B



【図 1 b】

図1C

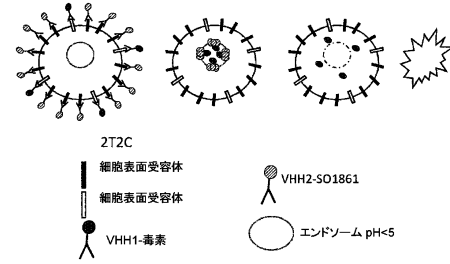
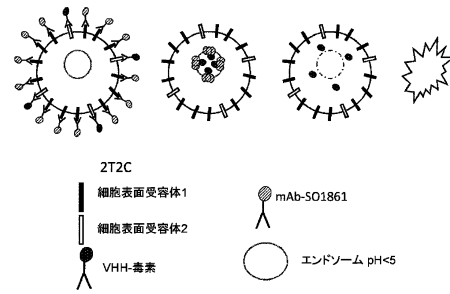


図1D



【図 1 c】

図1E

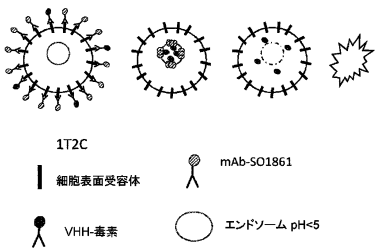
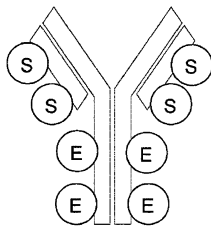


図1F



【図 1 d】

図1G

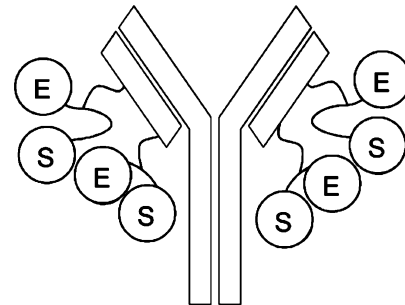


図1H

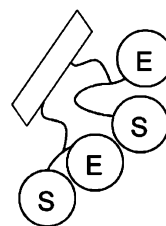


図1I



10

20

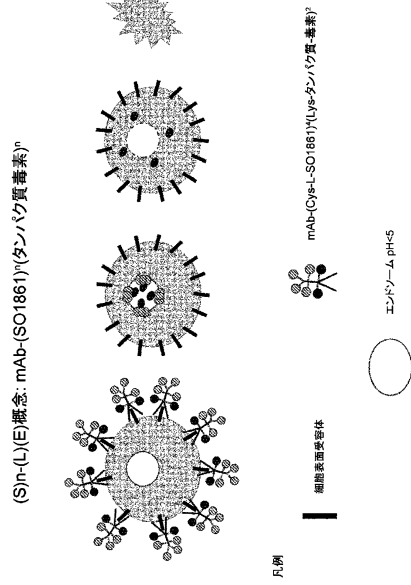
30

40

50

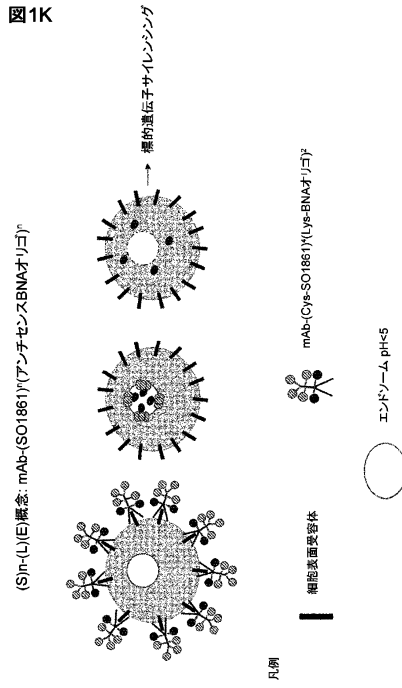
【図 1 e】

図 1J



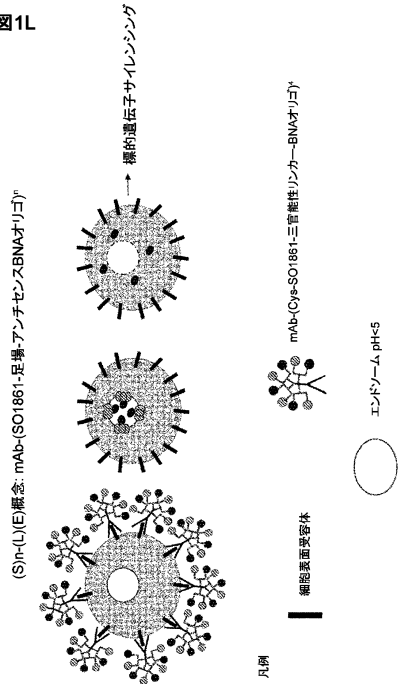
【図 1 f】

図 1K



【図 1 g】

図 1L



【図 2】

図 2A

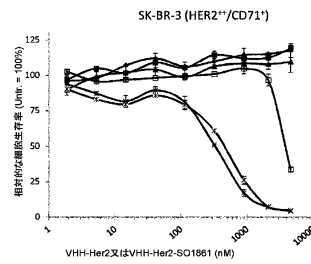
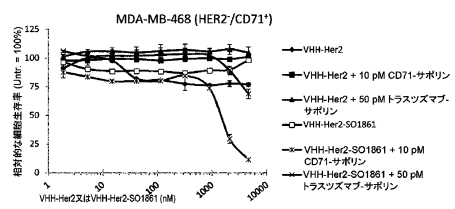


図 2B



10

20

30

40

50

【図 3】

図3A

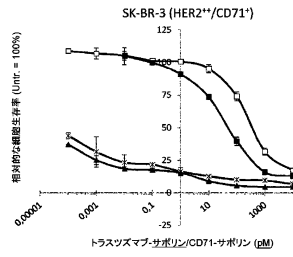
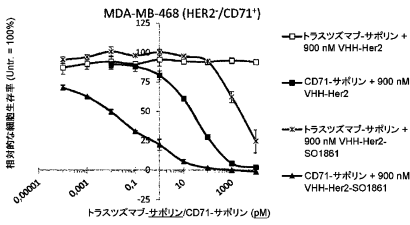


図3B



【図 4】

図4A

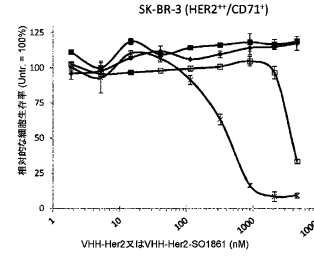
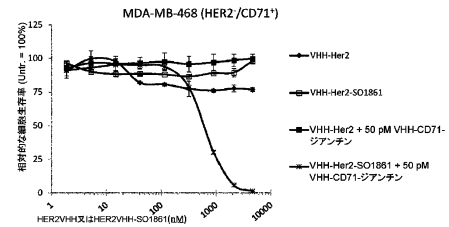


図4B



【図 5】

図5A

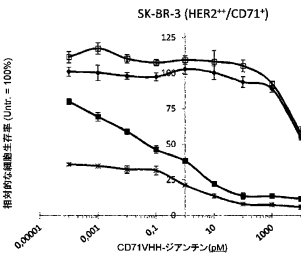
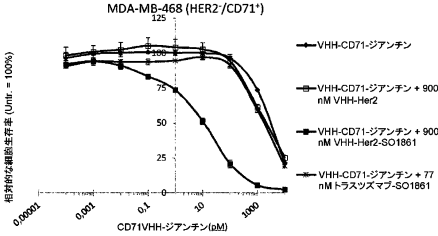


図5B



【図 6】

図6A

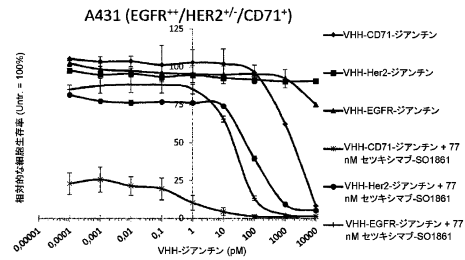
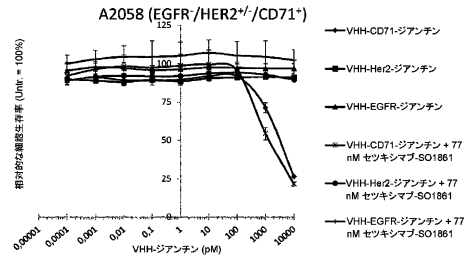


図6B



10

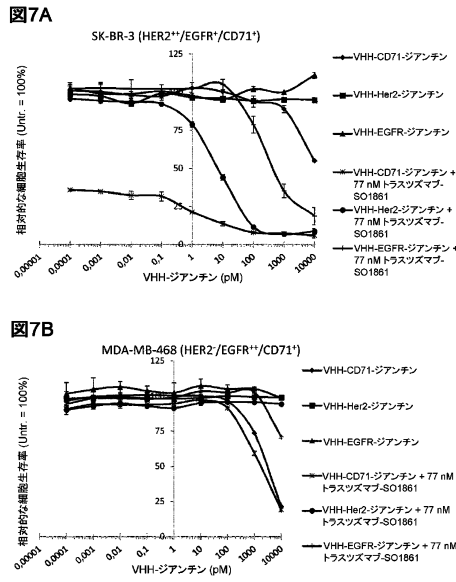
20

30

40

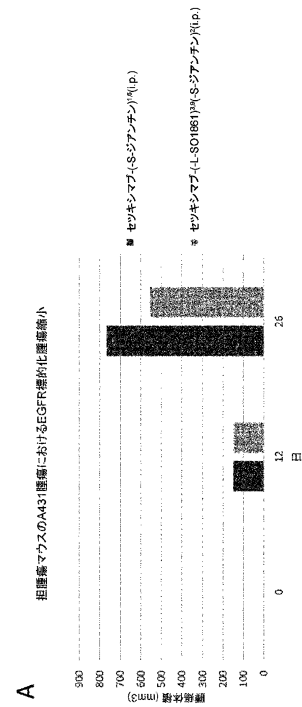
50

【図 7】

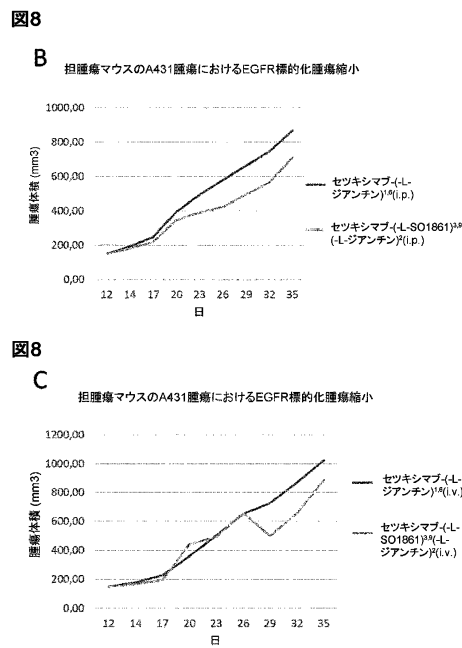


【図 8 a】

図8



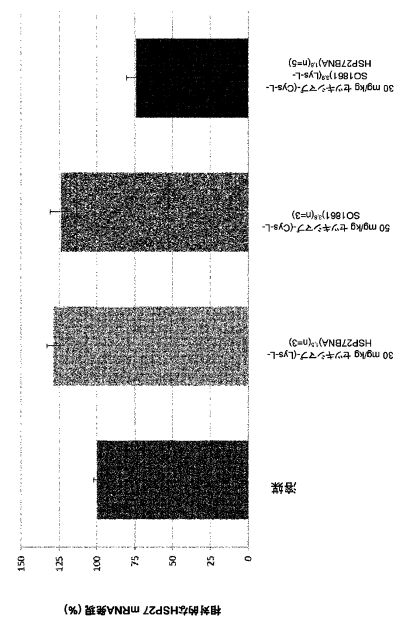
【図 8 b】



【図 9】

図9

拒腫瘍マウスのA431腫瘍におけるEGFR標的化HSP27遺伝子サイレンシング



10

20

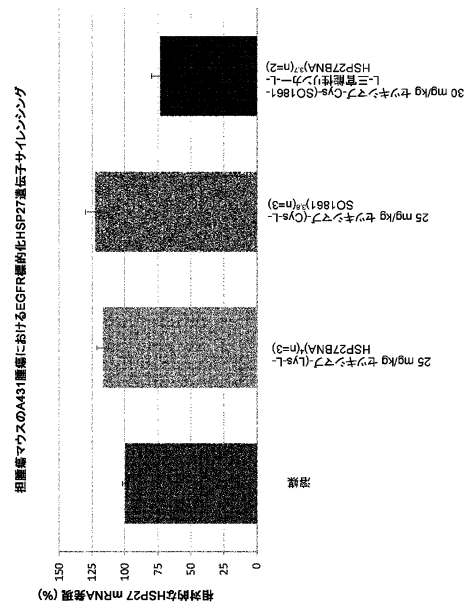
30

40

50

【図 1 0】

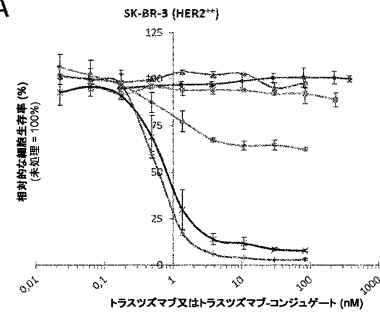
図10



【図 1 1 a】

図11

A

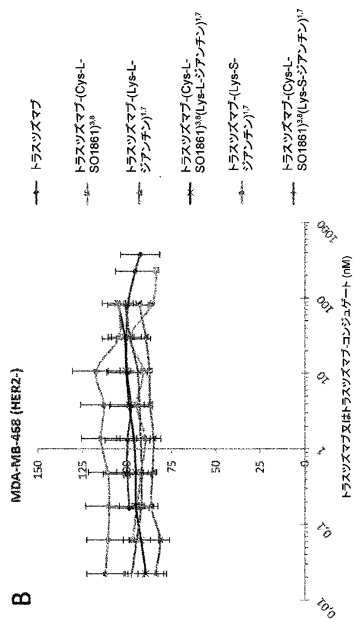


10

20

【図 1 1 b】

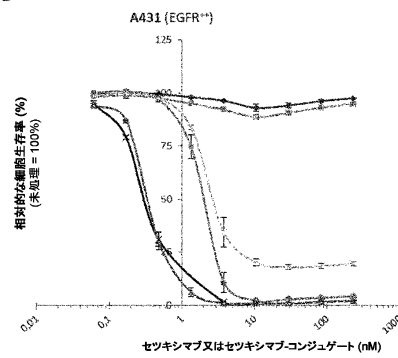
図11



【図 1 1 c】

図11

C



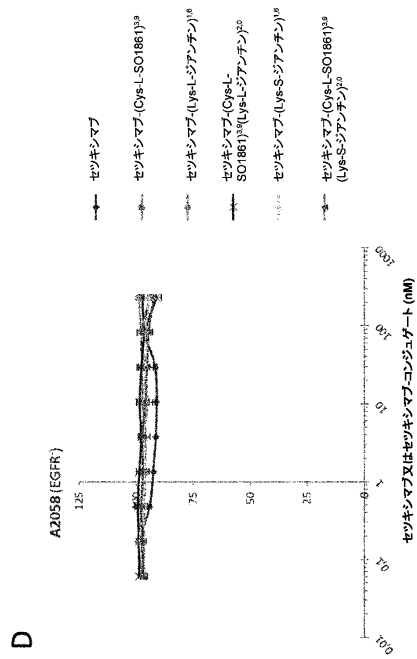
30

40

50

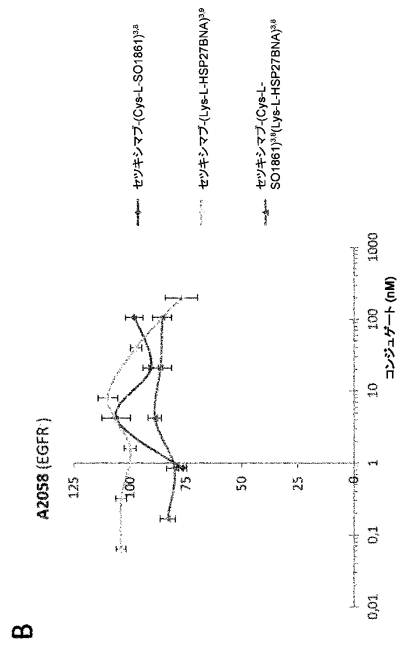
【図 1 1 d】

図 11



【図 1 2 b】

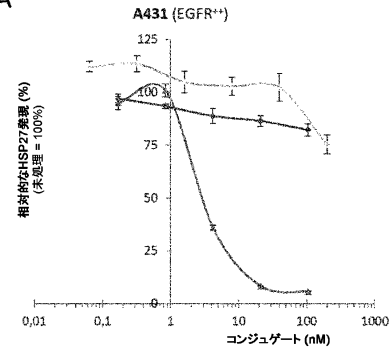
図 12



【図 1 2 a】

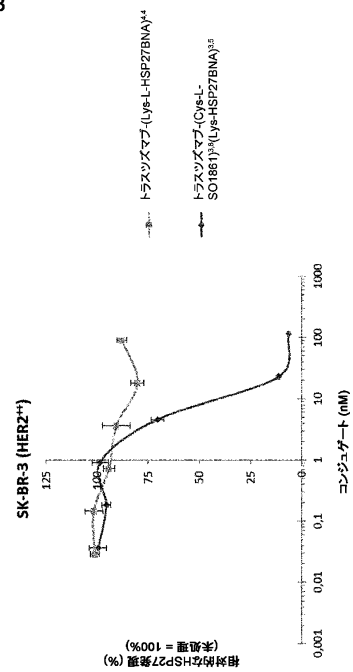
図 12

A



【図 1 3】

図 13



10

20

30

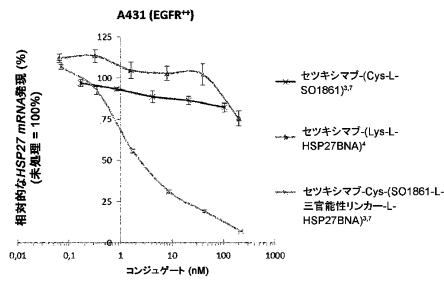
40

50

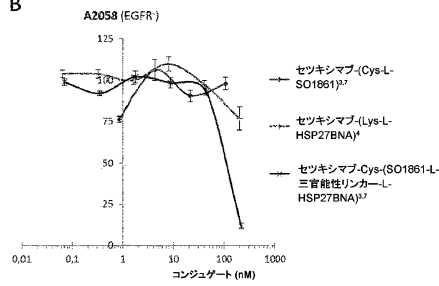
【図 1 4】

図14

A

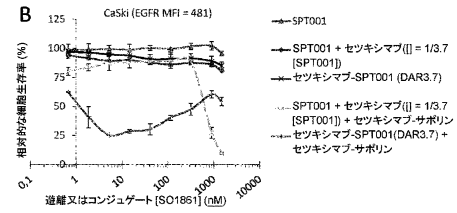
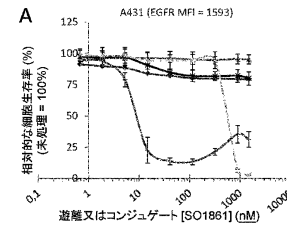


B



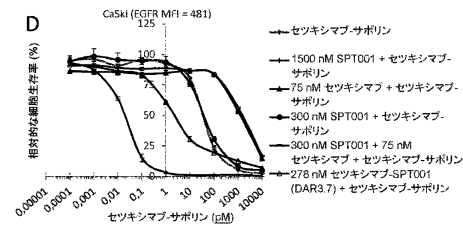
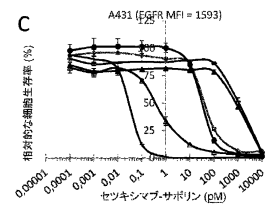
【図 1 5 a】

図15



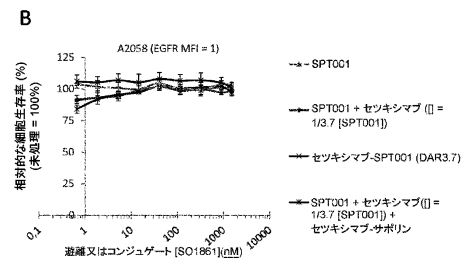
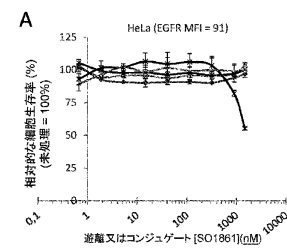
【図 1 5 b】

図15



【図 1 6 a】

図16



10

20

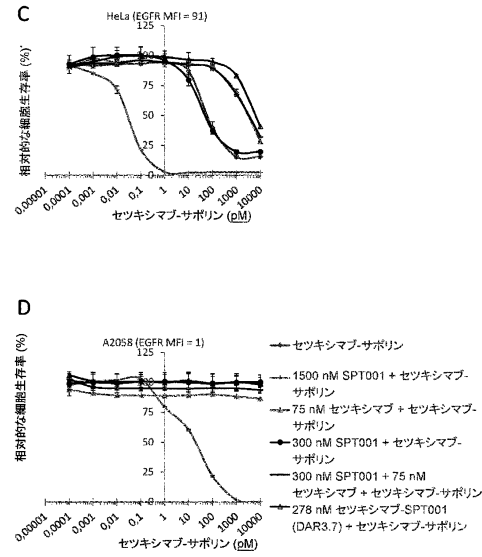
30

40

50

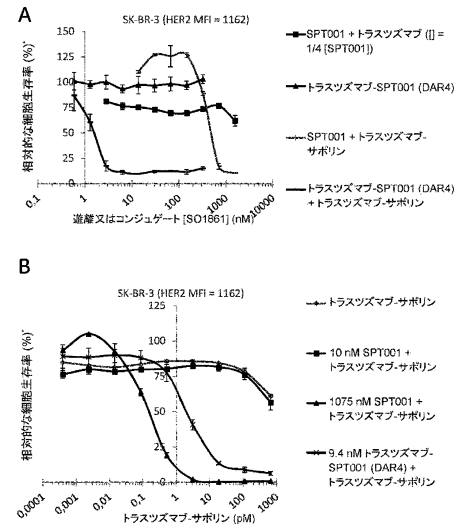
【図 16 b】

図16



【図 17】

図17

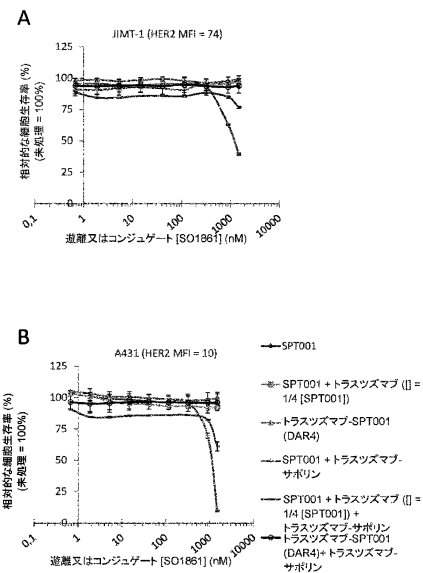


10

20

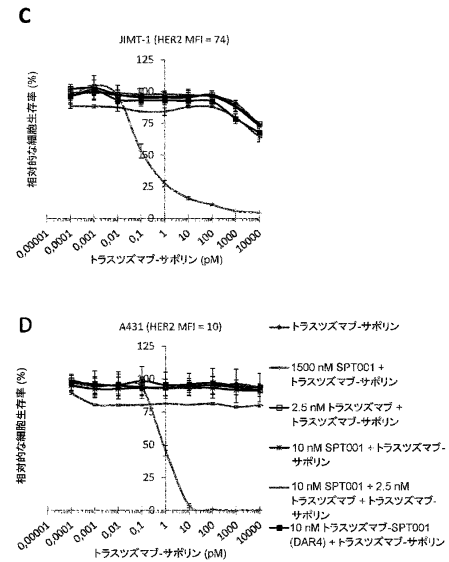
【図 18 a】

図18



【図 18 b】

図18



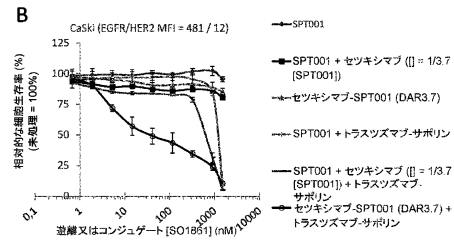
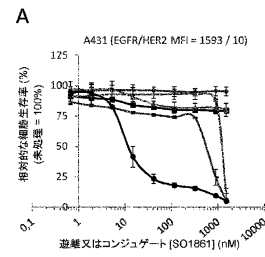
30

40

50

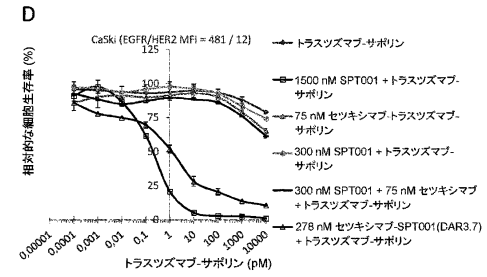
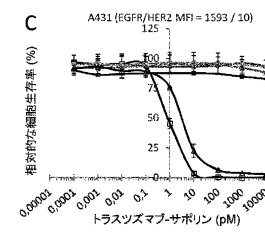
【図 19 a】

図19



【図 19 b】

図19

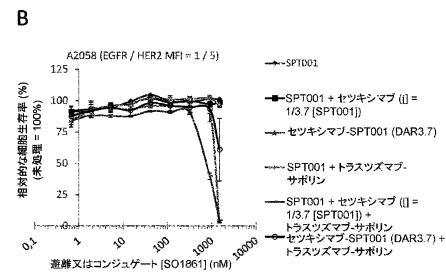
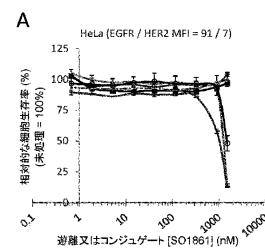


10

20

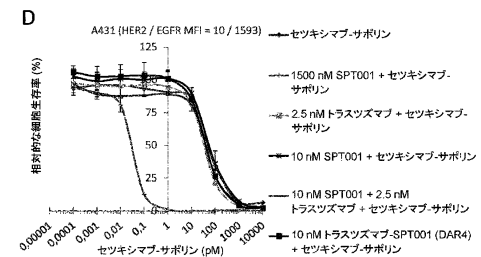
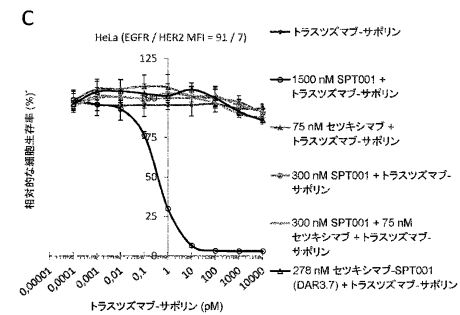
【図 20 a】

図20



【図 20 b】

図20



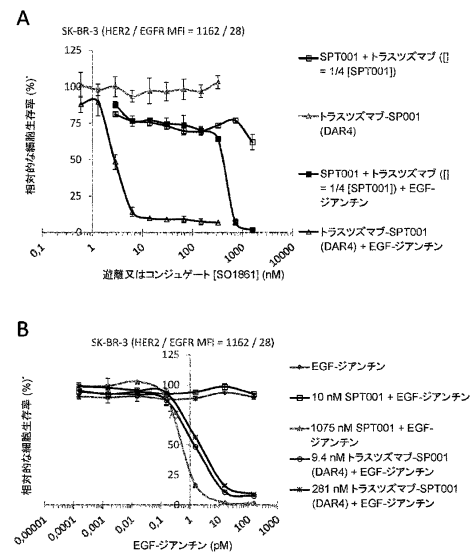
30

40

50

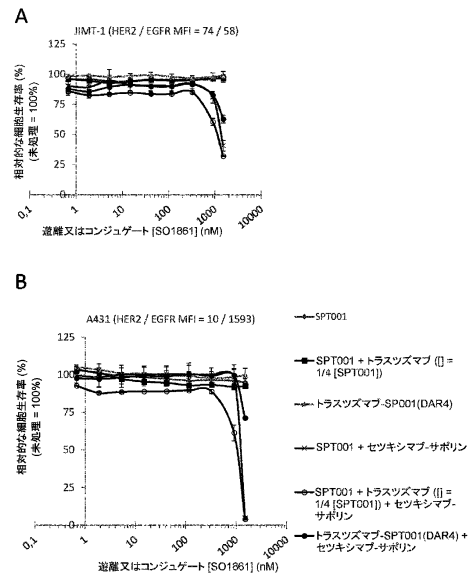
【図 2 1】

図21



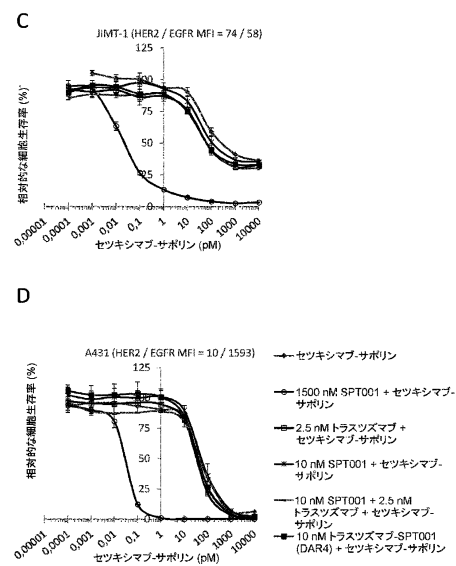
【図 2 2 a】

図22



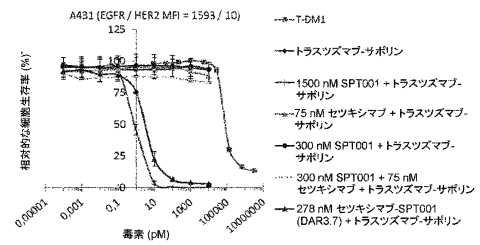
【図 2 2 b】

図22



【図 2 3】

図23



10

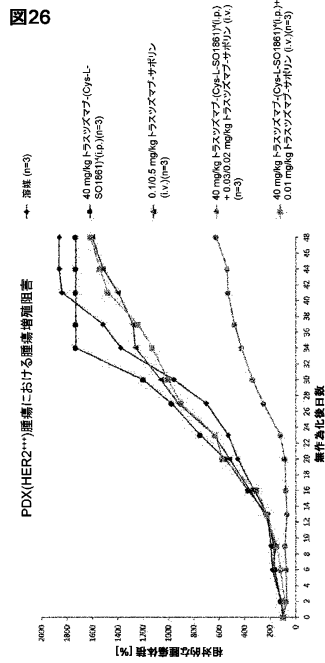
20

30

40

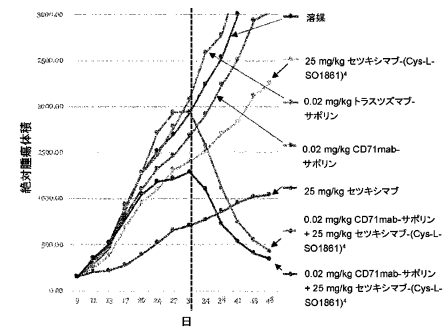
50

【図 26】

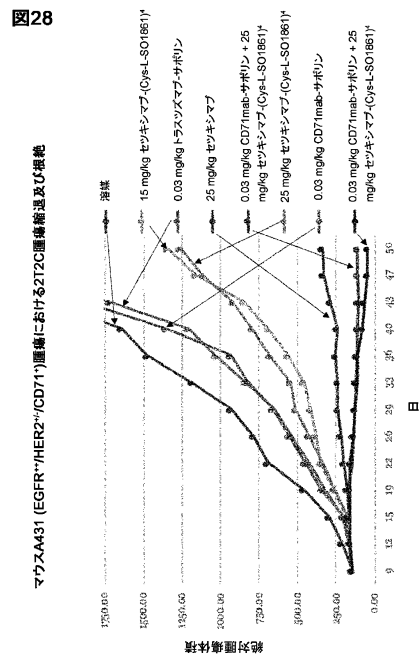


【図 27】

図27

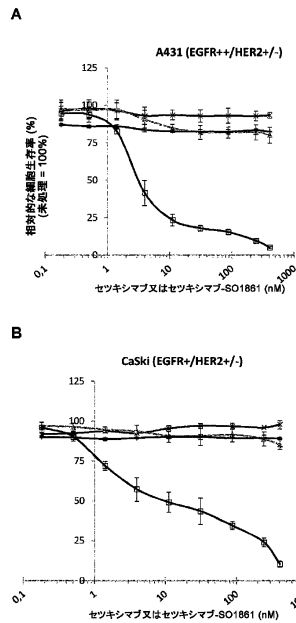
マウスA431 (EGFR^{+/+}/HER2^{+/+}/CD71⁺)腫瘍における2T2C腫瘍増殖

【図 28】



【図 29 a】

図29



10

20

30

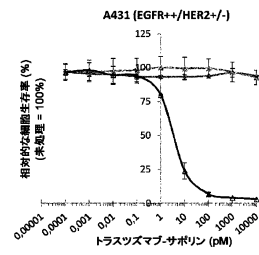
40

50

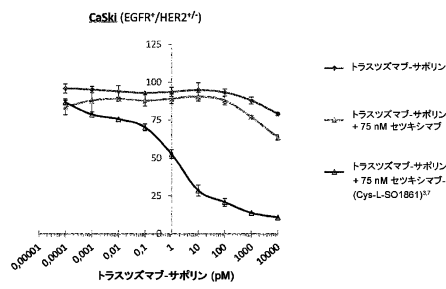
【図 29 b】

図29

C



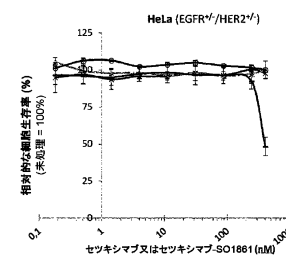
D



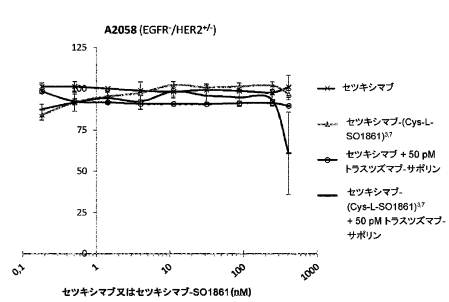
【図 30 a】

図30

A



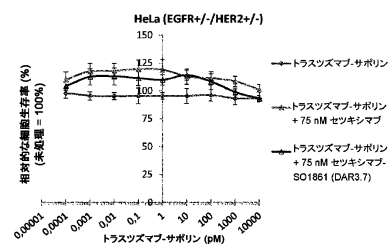
B



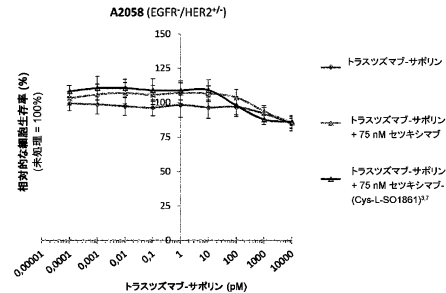
【図 30 b】

図30

C



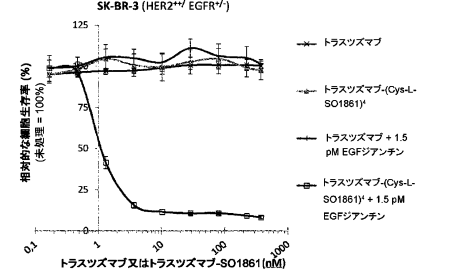
D



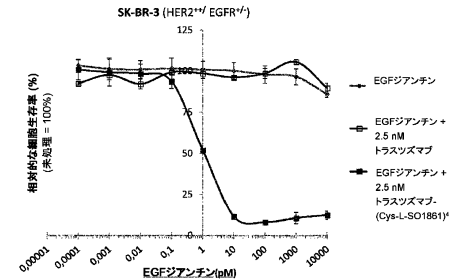
【図 31】

図31

A



B



10

20

30

40

50

【図 3 2 a】

【図 3 2 b】

図32

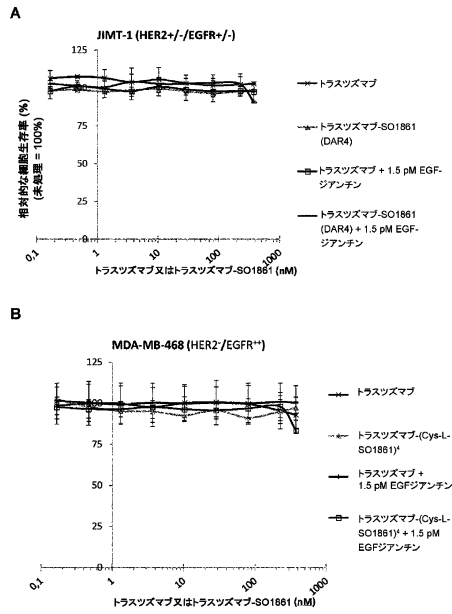
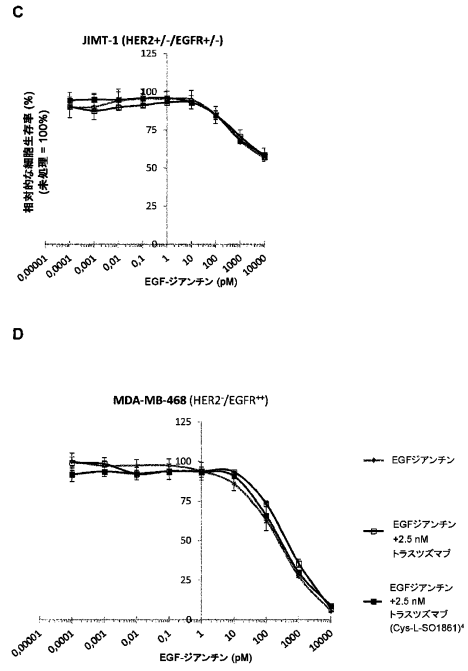


図32



10

20

【図 3 3】

【図 3 4 a】

図33

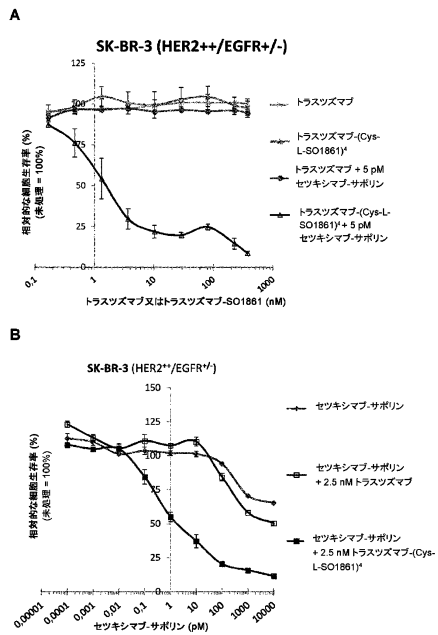
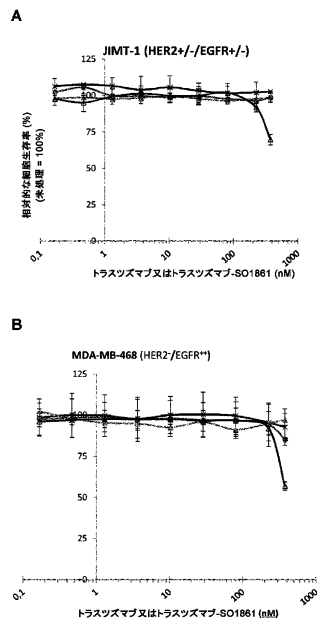


図34



30

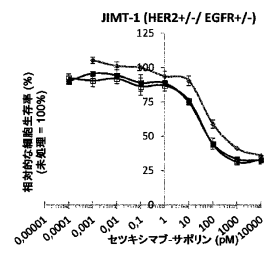
40

50

【図 3 4 b】

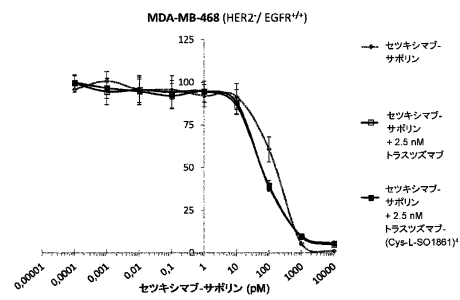
図34

C



10

D



20

【配列表】

0007652807000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	C
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	A 6 1 P	7/00	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/87	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	9/14	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
			C 1 2 N	15/13	Z N A
			C 1 2 N	15/87	Z
			C 1 2 N	9/14	

(72)発明者 ポステル, ルーベン

オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフェン, アントニ ファン レーウェンフック 9,
ビルディング アー 1 2 - 1

(72)発明者 ヘアマンス, ガイ

オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフェン, アントニ ファン レーウェンフック 9,
ビルディング アー 1 2 - 1

(72)発明者 フュッヒ, ヘンドリック

ドイツ連邦共和国, デー ー 1 3 3 5 3 ベルリン アウグステンブルガー ブラッツ 1 フィルヒョ
ウークリニック シャリテーユニヴェルズィテートメディツィーン, ベルリン キャンパス クリニ
シェ ヒェミー ウント パトバイオヒェミー インスティテュート フュア ラボラトリーウムスメデ
イツィン

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 0 5 9 5 8 (J P , A)

Hendrik FUCHS et al., " Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targ
eted Tumor Therapies ", Biomedicines, 2017年03月29日, Vol. 5, No. 4, p.14, DOI: 10.3
390/biomedicines5020014Cheenu BHARGAVA et al., " Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcin
oma when applied in combination wi, Molecular Oncology, 2017年09月15日, Vol. 11, N
o. 11, p.1527-1543, DOI: 10.1002/1878-0261.12115Roger GILABERT-ORIOLE et al., " Immunotoxins Constructed with Ribosome-Inactivating Pro
teins and their Enhancers: A Lethal Cocktai, Current Pharmaceutical Design, 2014年10月
22日, Vol. 20, No. 42, p.6584-6643, DOI: 10.2174/1381612820666140826153913Xue-Wei CAO et al., " Analysis of Triterpenoid Saponins Reveals Insights into Structural Fea
tures Associated with Potent Protein Drug Enhancement Effects ", Molecular Pharmaceutic
s, 2020年01月17日, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01158

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 N 1 5 / 8 7

C 1 2 N 9 / 1 4

C 1 2 P 2 1 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)